



Régulation de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à l'exposition UV : implications du facteur de transcription USF1 dans le contrôle de la disponibilité de la protéine p53

Amine Bouafia

► To cite this version:

Amine Bouafia. Régulation de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à l'exposition UV : implications du facteur de transcription USF1 dans le contrôle de la disponibilité de la protéine p53. Cancer. Université de Rennes, 2014. Français. NNT : 2014REN1S129 . tel-01146428

HAL Id: tel-01146428

<https://theses.hal.science/tel-01146428>

Submitted on 28 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale VAS

présentée par

Amine Bouafia

Préparée à l'unité de recherche UMR6290 IGDR, équipe GEO
Institut de Génétique et Développement de Rennes
Equipe Expression des Gènes et Oncogenèse
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Régulation de l'arrêt
du cycle cellulaire en
réponse à
l'exposition UV,
implications du
facteur de
transcription USF1
dans le contrôle de la
disponibilité de la
protéine p53**

**Thèse soutenue à Rennes
le 27/03/2014**

devant le jury composé de :

Eliette Touati

Chargée de Recherche - Institut Pasteur/ *rapporteur*

Thierry Magnaldo

Directeur de recherche- IRCAN / *rapporteur*

Sophie Tartare

Directrice de Recherche-C3M/ *examineur*

Christian Jaulin

Directeur de Recherche-IGDR/ *examineur*

Marie-Dominique Galibert

Professeur-IGDR/ *directrice de thèse*

*Al-Qayyūm, Kheira, Inda, Wissal, Samira et Aiya, merci pour
votre soutien indéfectible.*

Remerciements

En avant-propos de ce manuscrit, je tiens à remercier l'ensemble des personnes et des institutions qui m'ont permis de réaliser mes travaux de thèse.

Tout à commencer il ya dix ans lorsque je prenais mon baluchon pour Paris et je découvrais "les laboratoires". Contribuerais-je un jour à la recherche ? La réponse est venue à moi, ou plutôt je suis allé vers la réponse que détenait le Professeur Marie-Dominique Galibert qui a accepté de m'intégrer à son équipe. Je vous remercie d'avoir su me galvaniser contre les aléas de la recherche, de m'avoir aidé à progresser scientifiquement, de votre appui et de votre confiance. Dans ce registre, je ne peux oublier mon co-directeur de thèse et ami, le Dr. Sébastien Corre. Tu m'as accompagné patiemment durant toute cette aventure de thèse et participé à renforcer la confiance en mon travail. J'ai été touché par l'amitié et le soutien que toi et Elodie m'avez témoignés. D'autres partenaires ont également beaucoup compté et fait que cette thèse soit agréable. Ma pensée s'adresse particulièrement aux Docteurs Nicolas Mouchet, Arianne Mogha et Audrey Valley que je remercie également.

Sous l'égide du Professeur Marie-Dominique Galibert, il existe une formidable équipe qui place une importance primordiale dans le partage du savoir-faire et des connaissances scientifiques. Je pense aux Docteurs David Gilot, Marie-Bérendère Troadec et au Professeur Virginie Gandemer qui m'ont fait évoluer dans le "design" de mes expériences et la clarté de mes messages scientifiques. D'un point de vue technique, je tiens à souligner l'importance de l'agréable Laura Bachelot avec laquelle j'ai directement pu interagir. Je n'oublie pas les autres membres, Anne-Gaëlle Rio et Marie-Pierre Arnaud qui contribuent également au "bon vivre" au sein de cette équipe.

Au delà de ce noyau, je tiens à remercier l'Institut de Génétique et Développement de Rennes qui constitue un environnement exceptionnel et propice à la recherche. La disponibilité de l'ensemble de ces membres, pour les questions scientifiques, permet très souvent de débloquent d'éventuels freins. Ces membres sont nombreux et tous importants mais je tiens à remercier tout particulièrement les Docteurs Christian Jaulin et Erwan Watrin avec lesquels j'ai échangé des discussions très enrichissantes.

Sur le plan international, je remercie le Professeur Marie-Dominique Galibert de m'avoir fait rencontrer des personnes exceptionnelles et particulièrement les Docteurs Sharon Prince et Colin Goding.

Enfin, je ne saurais clore cet avant-propos par des remerciements à ma famille qui m'a patiemment attendue et soutenue tout au long de ce parcours.

Sommaire

Remerciements.....	2
Sommaire.....	3
Tables des illustrations	8
Abréviations du manuscrit	10
Thématique de recherche	12

Chapitre 1 L'exposition UV, un facteur de risque majeur de la transformation des cellules cutanées..... 13

1. La peau, structure et fonction.....	13
1.1. L'épiderme.....	13
1.1.1. Les kératinocytes	15
1.1.2. Les mélanocytes.....	17
1.1.3. Les cellules de Langherans.....	18
1.1.4. Les cellules de Merkel.....	18
1.1.5. La jonction dermo-épidermique	18
1.2. Le derme	19
1.3. L'hypoderme	19
1.4. Les annexes cutanées.....	19
1.5. Follicule pileux et glandes sébacées	20
1.6. Les glandes sudoripares	20
2. Les UV et leurs effets carcinogènes.....	21
2.1. Nature des UV.....	21
2.2. Dommages à l'ADN liés à l'exposition UV et mutagénicité.....	23
2.2.1. Les UVA.....	23
2.2.1.1. Mécanisme de photosensibilisation et espèces réactive de l'oxygène (ROS)	23
2.2.1.2. Dommages à l'ADN de type 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-Gua).....	25
2.2.1.3. Dommages à l'ADN de type dimère de cyclobutane pyrimide (CPD).....	25
2.2.2. Les UVB.....	27
2.2.2.1. Dommages à l'ADN de type dimère de bases ; dimère de cyclobutane pyrimide (CPD), 6-4 pyrimidine pyrimidone (6-4PP) et isomères de Dewar	27

2.2.3.	Les UVC.....	31
3.	Les cancers cutanés associés à l'exposition UV.....	31
3.1.	Les UV des carcinogènes complets.....	32
3.2.	Les différents cancers cutanés.....	33
3.2.1.	Les carcinomes.....	33
3.2.1.1.	Le carcinome basocellulaire (BCC).....	33
3.2.1.2.	Le carcinome squameux ou spinocellulaire (SCC).....	33
3.2.2.	Le mélanome (MM).....	35
3.3.	Gènes présentant des marques de l'exposition UV et leurs contributions à la carcinogenèse cutanée.....	36
3.3.1.	Altération du gène <i>TP53</i>	37
3.3.2.	Altération du gène <i>CDKN2A</i>	39
3.3.3.	Altération du gène <i>RAS</i>	40
3.3.4.	Altération du gène <i>PTEN</i>	41
3.3.5.	Altération des gènes de la voie PTH/SHH.....	41

Chapitre 2 Les systèmes de défenses cellulaires contre l'instabilité génomique promue par l'exposition UV 43

1.	Notions de réponse précoce et réponse tardive à l'exposition UV.....	43
2.	Réponse précoce à l'exposition UV.....	43
2.1.	Reconnaissance des dommages et transduction du signal de stress.....	43
2.1.1.	Les voies ATM/ATR.....	45
2.1.2.	La voie DNAPK.....	46
2.1.3.	La voie des MAPKs, JNK et p38.....	46
2.2.	Blocage du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN.....	47
2.2.1.	Voies canoniques faisant intervenir les kinases ATM et ATR.....	47
2.2.1.1.	L'arrêt G1/S et intra-S en réponse aux dommages à l'ADN.....	47
2.2.1.2.	L'arrêt G2/M en réponse aux dommages à l'ADN.....	48
2.2.2.	Voies non canoniques de contrôle du cycle en réponse aux dommages à l'ADN	50
2.3.	La réparation de l'ADN.....	52
2.3.1.	Mécanisme de la réparation par excision de nucléotides (NER).....	54
2.3.2.	Régulation du NER à la suite de l'exposition UV.....	56

2.4.	L'apoptose.....	57
2.4.1.	Mécanisme général de l'apoptose	57
2.4.2.	Activation de l'apoptose par les UV	58
3.	Réponse tardive	62
3.1.	La pigmentation	62
3.1.1.	Synthèse basale de la mélanine	62
3.1.2.	Maturation des mélanosomes	64
3.1.3.	Transfert des mélanosomes aux kératinocytes	64
3.2.	Régulation de la pigmentation basale.....	65
3.2.1.	Les dérivés de la pro-opiomélanocortine (POMC), l' α -MSH, l'ACTH et le récepteur MC1R	65
3.2.2.	Les endothélines et leurs récepteurs.....	66
3.2.3.	Les facteurs de croissance SCF et b-FGF et leurs récepteurs, c-Kit et FGFR	66
3.3.	Induction de la pigmentation en réponse à l'exposition UV	68

Chapitre 3 Régulation des systèmes de protection par les facteurs de transcription, rôle central des protéines p53 et USF1 71

1.	Régulation de la disponibilité de la protéine p53 en réponse au stress UV, un enjeu capital dans la prévention de l'instabilité génomique	71
1.1.	La découverte de p53	71
1.2.	Un suppresseur de tumeur central dans la protection contre les effets délétères des UV.....	72
1.3.	Mécanisme de régulation de la disponibilité cellulaire en protéine p53.....	74
1.3.1.	La famille p53.....	74
1.3.2.	Les protéines codées par <i>TP53</i>	75
1.3.2.1.	L'isoforme p53 α	75
1.3.2.2.	Les autres isoformes de p53	76
1.3.3.	La régulation basal et UV induite de l'ARNm <i>TP53</i>	76
1.3.3.1.	Variations de l'expression du transcrit <i>TP53</i> , impacts sur la réponse aux dommages à l'ADN.....	78
1.3.3.2.	Régulation du promoteur de <i>TP53</i>	80
1.3.4.	Régulation post-traductionnelle de p53	82
1.3.4.1.	Maintien du niveau cellulaire minimal de p53 en absence de stress, rôle fondamental de MDM2.....	82

1.3.4.2.	Importance de l'ubiquitine ligase MDM2 dans le contrôle de p53.....	83
1.3.4.3.	Liaison p53-MDM2 et ubiquitination de p53	83
1.3.4.4.	Importance de MDMX/4, un homologue de MDM2 non substituable et complémentaire	85
1.3.4.5.	Inhibition de l'interaction p53-MDM2 en réponse aux UV.....	85
1.3.4.5.1.	Inhibition de l'expression de MDM2 en réponse à l'exposition UV	85
1.3.4.5.2.	Influence des phosphorylations de p53 et de MDM2 induites par les kinases de stress.....	86
1.3.4.5.3.	L'influence de l'acétylation de p53 induite par CBP/p300	87
1.3.4.5.4.	L'interaction de p14 ^{ARF} avec MDM2	89
1.3.4.5.5.	L'inhibition du complexe p53-MDM2 par les interactions protéine-protéine, influence particulière des facteurs de transcription	90
2.	Le facteur de transcription USF1, un nouveau suppresseur de tumeur en réponse au stress UV ?	91
2.1.	Structure et domaines fonctionnels des protéines USF	92
2.1.1.	Gènes codants pour les protéines USF.....	92
2.1.2.	Domaines fonctionnelles des protéines USF.....	92
2.2.	Implication d'USF1 dans la transcription générale et, la transcription stress dépendante.....	94
2.2.1.	Intervention de la protéine USF1 dans la transcription générale	94
2.2.2.	Intervention de la protéine USF1 dans la transcription stress dépendante .	95
2.2.2.1.	Modifications post-traductionnelles d'USF1 en réponse au stress.....	95
2.2.2.2.	Stress inducteurs et cibles transcriptionnelles d'USF1.....	96
2.3.	Rôle antiprolifératif d'USF1, impact potentiel dans la réponse UV ?	97
Chapitre 4 Contexte, travaux et résultats de thèse.....		98
1.	Introduction.....	98
1.1.	Contexte scientifique et problématique	98
1.2.	Questions scientifiques adressées	99
2.	Résultats.....	100
2.1.	Lien fonctionnel entre les protéines USF1 et p53 en réponse à l'exposition UV	100
2.1.1.	Article 1, USF1 est nécessaire à la stabilisation et à l'arrêt transitoire du cycle cellulaire dépendant de p53 en réponse à l'exposition UV	100
2.1.1.1.	Copie de l'Article 1	102

2.1.2. Article 2, Selon l'intensité du stress, l'activité transcriptionnelle intrinsèque d'USF1, en collaboration avec d'autres b-HLH/LZ, intervient dans la régulation du gène <i>CDKN1A</i>	103
2.1.2.1. Copie de l'Article 2	105
2.1.3. Résultats supplémentaires, Identification des réseaux transcriptionnels contrôlés par la protéine USF1 en réponse à l'exposition UV.....	106
2.1.3.1. Le transcriptome des souris invalidées pour USF1 révèle une altération de la réponse globale aux UV et de plusieurs gènes cibles de p53.....	107
3. Discussion et perspectives.....	113
3.1. Mise en évidence d'une coopération entre les voies de réponse au stress USF1 et p53 dans la régulation fine du cycle cellulaire en réponse à l'exposition UVB	113
3.1.1. La régulation de p53, une nouvelle fonction d'USF1 nécessaire à la prévention de l'instabilité génomique induite par les doses physiologiques d'UVB	113
3.1.2. Coopération des voies USF1 et p53 dans le contrôle de gènes nécessaires à la prévention de l'instabilité génomique à des doses élevées d'UVB	116
3.2. Rôle potentiel de la perte d'USF1 dans l'instabilité génomique et la transformation cellulaires induites par les UV et les toxiques environnementaux..	117
3.3. Directions Futures.....	118
Chapitre 5 Annexes, congrès et bibliographie	120
1. Annexes	121
2. Congrès, Présentations	127
3. Bibliographie	128

Tables des illustrations

Figures

Figure 1 : Structure générale de la peau.	14
Figure 2 : Les différentes cellules de l'épiderme.	14
Figure 3 : kératinisation de l'épiderme interfolliculaire.....	16
Figure 4 : Spectre électromagnétique et pénétration des UV solaires dans la peau.....	22
Figure 5 : Mécanismes généraux de photosensibilisation et formation de 8-oxodG	24
Figure 6 : Dommages à l'ADN formés après l'exposition UV.	26
Figure 7 : Spectres mutationnels associés à l'exposition UV.....	28
Figure 8 : Phototypes et développement des cancers cutanés liés à l'exposition UV.....	30
Figure 9 : Cancers cutanés liés à l'exposition UV et mutations associés à l'exposition UV dans la progression du mélanome.....	34
Figure 10 : Recrutement d'ATM et d'ATR aux sites lésionnels sur d'ADN.....	44
Figure 11 : Voies canoniques d'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN induits par les UV.....	49
Figure 12 : Voies d'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN faisant intervenir la kinase p38.....	51
Figure 13 : Réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER).	55
Figure 14 : Mécanisme générale de l'apoptose.....	59
Figure 15 : Activation de l'apoptose en réponse aux UV.	61
Figure 16 : Synthèse de la mélanine et formation des mélanosomes.	63
Figure 17 : Régulation de la pigmentation constitutive et inductible par les UV.....	67
Figure 18 : Rôle pléiotropique de la protéine p53 dans la réponse à l'exposition UV.....	73
Figure 19 : Structure du gène et de la protéine p53.	77
Figure 20 : Régulation transcriptionnelle du gène <i>TP53</i>	79
Figure 21 : Structure des protéines MDM2, MDMX et Ubiquitination de p53.	84
Figure 22 : Mécanisme d'acétylation de p53 par CBP/p300.....	88
Figure 23 : Domaines fonctionnels et intervention de la protéine USF1 dans la réponse au stress environnemental.....	93
Figure 24 : Résultats supplémentaires n°1, choix et pré-validations des échantillons cutanés en vue de l'analyse transcriptomique de la réponse des souris <i>Usf1</i> KO à l'exposition UVB.	109
Figure 25 : Résultats supplémentaires n°2, analyse par microarray des gènes différentiellement exprimés dans le tissu cutané des souris sauvages et invalidées pour <i>Usf1</i> exposé aux UVB.	110
Figure 26 : Résultats supplémentaires n°4, validation des transcrits modulés en réponse à l'exposition UVB dans les souris sauvages ou invalidées pour USF1.	112
Figure 27 : Schéma de synthèse sur l'interaction potentielle des voies USF1 et p53 en réponse aux effets délétères de l'exposition UVB.....	114

Tableaux

Tableau 1 : Part des mutations associées à l'exposition UV dans les différents cancers.	38
Tableau 2 : Maladies associées à des mutations des gènes du NER.	53
Tableau 3 : Résultats supplémentaires n°3, gènes communs chez l'Homme et la souris en réponse à l'exposition UVB.	111

Annexes

Annexe 1 : Résultats complémentaires Article 1.	121
Annexe 2 : Résultats complémentaires Article 1.	122
Annexe 3 : Résultats complémentaires Article 1.	123
Annexe 4 : Résultats complémentaires Article 1.	123
Annexe 5 : Promoteur du gène murin <i>CDKN1A</i>	124
Annexe 6 : Poster n°1	125
Annexe 7 : Poster n°2	126

Abréviations du manuscrit

6-4PP : 6-4 pyrimidine pyrimidone
8-oxo-Gua: 8-oxo-7,8-dihydroguanine
ATF3 : Activating Transcription Factor 3
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR : Ataxia Telangiectasia And Rad3 Related
BCC : Carcinome basocellulaire
CDC45 : Cell Division Cycle 45
Cdk : Cell Devision Kinase
CDK : Cyclin-Dependent Kinase
CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CHK1/2 : Checkpoint Kinase 1/2
CKI : Cyclin-dependent Kinase Inhibitor
CKN1A : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A
CPD : Dimère de cyclobutane pyrimide
DCT : Dopachrome Tautomerase
DNAPK : DNA-dependent Proteine Kinase
ERK : Extracellular signal-regulated kinases
GADD45 : Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible 45
GGR : Global Genome Repair
GGR : Global Genome Repair
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KI : Knock-In
KO : Knock-Out
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MC1R :Melanocortin Receptor 1
MDM2 : Mouse double minute 2
MDMX/4 : Mouse double minute X/4
MITF : Microphthalmia
MM : Malignant Melnaoma
NER : Nucleotide excision repair
PIKK : Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases family
POMC : Pro-opiomelanocortin
ROS : Reactive Oxygen Species
SCC : Carcinome spinocellulaire ou épidermoïde
SFN : Stratifin ou 14-3-3 Sigma
TCR : Transcription Coupled Repair
TP53 : Tumor Protein P53
TRP-1 : Tyrosinase-Related 1rotein 1 ou DHICA Oxydase
TYR :Tyrosinase
USF1 : Upstream Stimulatory Factor 1

UV : Ultraviolets

UVB : UV de type B

XP : Xeroderma Pigmentosum

XPA à **XPG** et **XPV** : Xeroderma Pigmentosum groupe A à G et V

YY1 : Yin and Yang 1 Protein

Thématique de recherche

L'exposition aux ultraviolets solaires (UV) représente un facteur de risque majeur dans le développement des cancers cutanés. Les UV endommagent l'ADN des cellules de l'épiderme et peuvent être responsables d'une instabilité génomique qui peut mener à la transformation maligne des cellules. L'OMS estime qu'à l'heure actuelle le nombre de cas de cancers cutanés au niveau mondial pourrait dépasser les 3 millions par an. Parmi ces cancers, le mélanome reste une préoccupation majeure du fait de son agressivité et de l'absence d'alternative thérapeutique efficace pour ce cancer redoutable.

Si les cellules cutanées sont très exposées aux effets carcinogènes des UV, elles sont également capables de mettre en place des programmes de protection à court et à moyens termes qui permettent de contrecarrer l'instabilité génomique potentiellement induite par les UV. Ces mécanismes de protection sont activés après modification du transcriptome des cellules en faveur de la régulation de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la pigmentation. L'initiation de ces programmes est liée à l'activation par les signaux de stress de facteurs de transcription qui régulent précisément le comportement cellulaire en fonction du niveau de dommages cellulaires. Parmi ces facteurs de transcription, le suppresseur de tumeur p53 joue un rôle capital dans la réponse cellulaire aux UV en régulant un vaste réseau génique qui permet de protéger l'intégrité du génome. L'importance de p53 est ainsi illustrée par sa perte de fonction dans plus de 50% des cancers en général et jusqu'à 90% des carcinomes cutanés. De plus, dans le mélanome, la dérégulation de p53 contribuerait de manière importante à l'agressivité de ce cancer. Ainsi, la connaissance des mécanismes de régulation de p53 s'avère essentielle à l'aune des stratégies thérapeutiques dans le cancer en général et dans le mélanome en particulier.

Dans les systèmes de protection cellulaire contre les effets délétères des UV, nous nous intéressons aux programmes contrôlés par les facteurs de transcription avec une attention particulière pour le facteur USF1. Notre laboratoire a montré pour la première fois que les UV induisaient la modulation de l'activité transcriptionnelle d'USF1 qui permettait alors la mise en place d'un programme de régulation de l'expression de gènes essentiels à la pigmentation et à la réparation de l'ADN des cellules cutanées. L'ensemble de nos données montre qu'USF1 orchestre un programme d'expression génétique en réponse à l'irradiation UV, avec vraisemblablement un rôle protecteur.

De manière importante, les facteurs p53 et USF1 sont activées dans les mêmes cinétiques et partagent des cibles transcriptionnelles communes en réponse aux agents endommageant l'ADN dont les UV. Au vue de l'importance de p53 et d'USF1 dans la réponse cellulaire aux UV, nous avons voulu évaluer s'il existait une relation entre les voies initiées par ces deux facteurs. Nos résultats, présentés dans ce manuscrit de thèse, suggèrent une nouvelle voie de régulation du suppresseur de tumeur p53 qui requiert le facteur USF1 en réponse au stress UV.

Chapitre 1 L'exposition UV, un facteur de risque majeur de la transformation des cellules cutanées

1. La peau, structure et fonction

La peau constitue le système tégumentaire qui couvre le corps et forme une interface entre le milieu extérieur et intérieur. La peau est ainsi le plus grand organe du corps (15% de la masse corporelle, 2 m² de surface) qui garantit une barrière directe contre les agressions environnementales de natures physiques, chimiques et biologiques. Cela comprend la protection des organes internes de ; la dessiccation par l'air, les dommages à l'ADN causés par les UV solaires, la pollution ou l'envahissement microbien. La peau assure également des fonctions métaboliques telles que l'hydro-régulation, la thermorégulation et l'initiation de la synthèse de la vitamine D nécessaire à l'homéostasie du calcium [1-5].

De façon générale, la peau est formée par la superposition de trois tissus respectivement de l'extérieure vers l'intérieure (**Figure 1**); (i) l'épiderme et ses annexes (follicules pilo-sébacées et glandes sudoripares), un tissu épithélial pavimenteux kératinisé, (ii) le derme, un tissu conjonctif de soutien, et (iii) l'hypoderme correspondant à un tissu adipeux. A ces structures sont associés des réseaux vasculaires (sanguins et lymphatiques) et nerveux qui émanent du muscle sous-jacent et qui traversent l'hypoderme et le derme pour finir dans les papilles dermiques. On distingue classiquement deux types de peau, la peau dite "épaisse" présente sur les faces plantaires et palmaires et, la peau "fine" retrouvée sur le reste du corps. Outre l'épaisseur des épidermes, les deux types de peaux se différencient par leur contenu en annexes épidermiques (follicules pileux et glandes sébacées présents uniquement dans la peau fine) et leur innervation (plus riche dans la peau épaisse) [3,4].

1.1. L'épiderme

L'épiderme (**Figure 1 et 2**), d'une épaisseur variant de 50 µm (peau des paupières) à 1 mm (peau des régions palmo-plantaires), correspond à un épithélium stratifié (Malpighien) et kératinisé en renouvellement constant. Son organisation reflète les stades de différenciation des kératinocytes qui le composent à plus de 90%. Ce processus de différenciation continu, appelé kératinisation (ou cornification), se déroule sur environ trente à quarante jours avant d'aboutir à la desquamation des couches superficielles de l'épiderme. Les différentes couches qui composent l'épiderme sont de l'intérieur vers l'extérieur ; la couche basale (une assise cellulaire), la couche épineuse (5 à 15 cellules superposées), la couche granuleuse (1 à 3 cellules), la couche claire (particulière aux régions palmo-plantaires) et la couche cornée (5 à 10 cellules) (**Figures 1 et 2**).

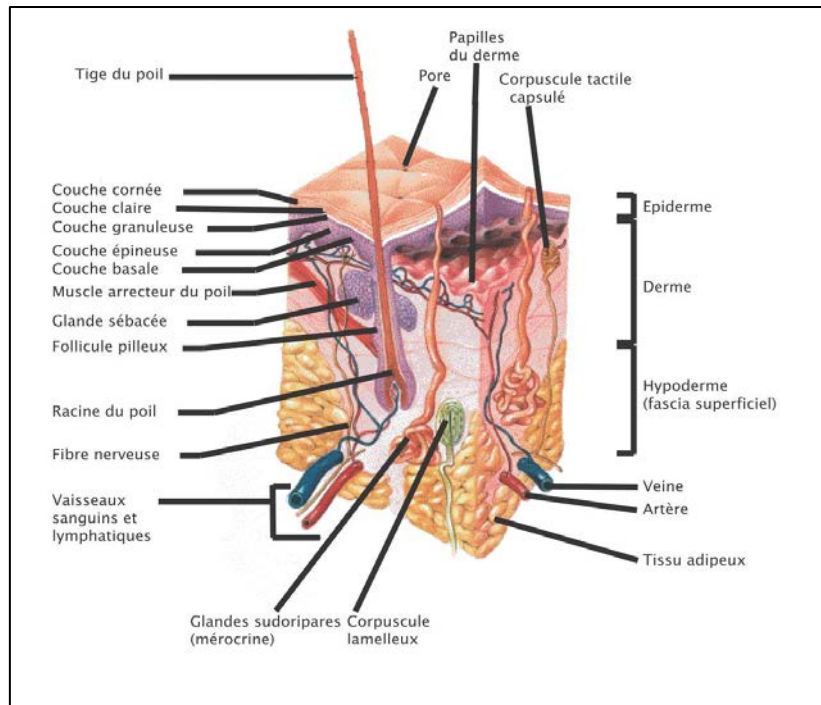


Figure 1 : Structure générale de la peau.

La peau est organisée en trois structures distinctes que sont l'épiderme, le derme et l'hypoderme. A ces dernières sont associées les annexes épidermiques qui comprennent les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares.

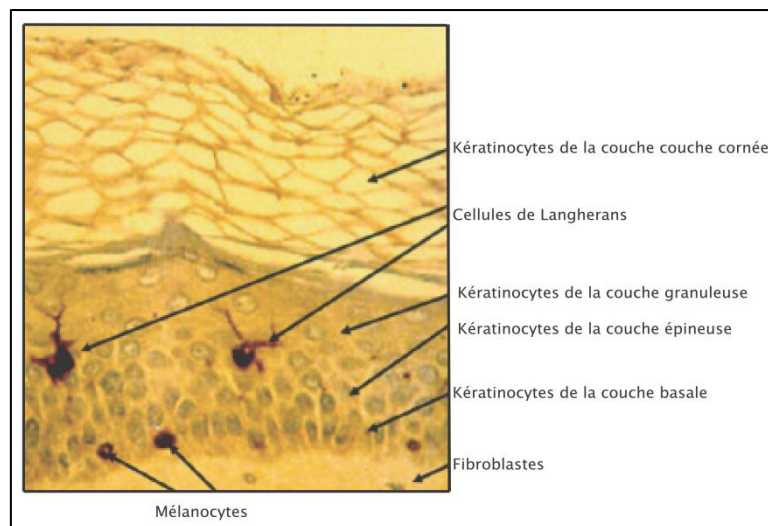


Figure 2 : Les différentes cellules de l'épiderme.

L'épiderme est constitué à plus de 90% de kératinocytes organisés en une structure malpighienne. Dans cette structure sont enchâssés des mélanocytes et des cellules de Langherans qui comptent pour moins de 10% de la population cellulaire totale de l'épiderme (Coupe histologique de peau humaine, adaptée de réf. [6]).

L'épiderme renferme d'autres types cellulaires comme les mélanocytes, les cellules de Merkel et les cellules de Langherans qui comptent pour moins de 10% du nombre total des cellules de l'épiderme (**Figure 2**). Les mélanocytes et les cellules de Merkel sont localisés entre les kératinocytes de la couche basale alors que les cellules de Langherans sont le plus souvent retrouvées entre les couches spinuse et granuleuse.

1.1.1. Les kératinocytes

Les kératinocytes sont des cellules d'origine ectodermique spécialisées dans la production de protéines fibreuses très résistantes et insolubles dans l'eau, les kératines. En s'associant aux jonctions d'ancrages (hémidesmosome, desmosome et gap junction), les kératines forment le cytosquelette des kératinocytes et assurent la cohésion de l'épiderme. Les kératines sont également l'unité structurale de bases des squames, des poils et des ongles obtenues à la fin du processus de kératinisation. Dans ce processus, au niveau de l'épiderme interfolliculaire à titre d'exemple, les kératinocytes sont organisés en plusieurs strates de cellules qui correspondent à la migration et à la différenciation progressive vers la surface de la peau de cellules souches se divisant à la base de l'épiderme. La finalité de ce processus est la formation d'une couche externe imperméable et photoprotectrice constituée de cellules mortes associées dans une matrice lipidique [6,7]. Ainsi, l'aspect et l'activité biochimique des kératinocytes dépendent de la couche épidermique dans laquelle ils se trouvent (**Figure 3**).

Les kératinocytes de la couche basale sont des cellules d'aspect cuboïde ou cylindrique qui expriment un réseau peu dense de kératines (K5-K14/K15). 10 % de ces cellules correspondent à des cellules souches qui se divisent de façon asymétrique pour générer des cellules à amplification transitoire (TAC) dont le nombre de division est limité (3 à 5 fois). La production de ces TAC palie à la fréquence rare de division des cellules souches (toute les 100h contre 200 à 400h) et assurent des stocks cellulaires suffisants. Les TAC migrent et commencent leur différenciation dans la couche supra-basale pour former la couche spinuse dans laquelle ils expriment un réseau dense de kératines (K1-K10) [3,8,9].

Les kératinocytes de la couche granulaire sont des cellules engagées dans un processus de différenciation terminale assimilé à une apoptose. Elles ont un aspect de plus en plus aplati à mesure de leur position dans la couche granulaire. En plus de leur contenu très dense (microfibrilles) en kératines (K2e-K11), les kératinocytes de cette couche contiennent deux types d'inclusions cytoplasmiques ; les grains de kératohyaline et les corps lamellaires. Les grains de kératohyaline sont de nature protéique et sont constitués majoritairement d'involucrine, de loricrine et de filaggrine.

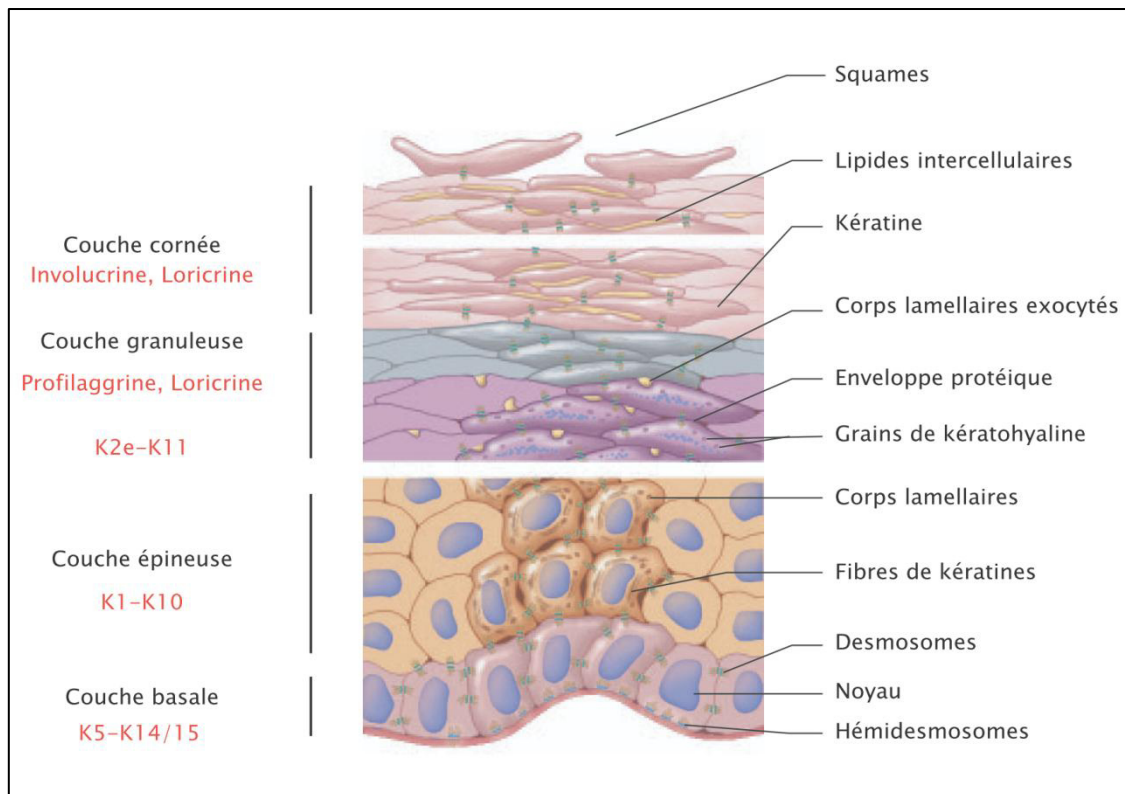


Figure 3 : kératinisation de l'épiderme interfolliculaire.

La kératinisation correspond au processus de différenciation kératinocytaire permettant de former la couche cornée. Il s'accompagne de la modification de la morphologie et de l'activité biochimique du kératinocyte. Ce processus aboutit à la formation d'une couche externe photoprotectrice et étanche. Celle-ci est formée de cellules mortes contenant majoritairement de la kératine dans une matrice intercellulaire de nature lipidique. En rouge sont indiqués les marqueurs majeurs de différenciation (Schéma adapté à partir de réf. [5])

Les corps lamellaires correspondent à deux types d'organites constitués respectivement de lipides polaires (phospholipides, acides gras libres) et d'enzymes (protéases, anti-protéases). La libération du contenu de ces organites participera à la formation du cornéocyte et d'une matrice intercellulaire hydrophobe [7,10].

Les cornéocytes, sont des cellules anucléées, dépourvues d'organites et complètement aplaties maintenues entre elles par des cornéodesmosomes et une matrice intercellulaire de nature lipidique. Les cornéocytes sont formés par des microfibrilles de kératines associées à de la fillagrine (80-90% de la masse du cornéocyte) recouvertes d'une enveloppe constituée sur sa face interne d'un agrégat protéique, majoritairement de l'involucrine (70%), et sur sa face externe de deux bicouches phospholipidiques comprenant des céramides (40% des lipides membranaires). Les longues chaînes carbonées des céramides s'associent à la partie protéique de l'enveloppe et irradiant vers l'espace intercellulaire où ils permettent d'organiser les lipides intercellulaires sous une configuration lamellaire participant ainsi à l'imperméabilisation de la couche cornée. En terme de protection, les produits de dégradation de la fillagrine, à savoir l'acide urocanique (UCA) et l'acide pyrrolidone carboxylique (PCA), constituent des facteurs hydratants naturels (NMF, Natural moisturizer Factor) pour la couche cornée et participent à la constitution d'un manteau acide (ph 4,5-5,5) réfractaire à l'envahissement microbien [7,10].

1.1.2. Les mélanocytes

Représentant 2 à 3% des cellules de l'épiderme, les mélanocytes, originaires de la crête neurale, constituent l'unité pigmentaire de la peau (également des cheveux et des yeux) (**Figure 2 et 3**). Leur densité, de 500 à 2000 par mm², est variable selon les régions du corps (rare dans la paume des mains, maximale dans la peau génitale) mais reste sensiblement identique entre individus de différents phototypes. Les mélanocytes sont enchâssés entre les kératinocytes de la couche basale (1 pour 10 kératinocytes) et émettent des dendrites qui leur permettent d'être en contact avec un grand nombre de kératinocytes (contact avec 40 kératinocytes). On les retrouve également dans la matrice du bulbe pileux où ils interviennent dans la pigmentation de la tige pileuse. Les mélanocytes ont des capacités prolifératives réduites et leur renouvellement pourrait être assuré par les mélanoblastes résidants dans la région du bulge du follicule pileux (Chap.1, sect.1.5.) [11,12].

Les mélanocytes produisent et distribuent les pigments mélaniques, phéomélanine (pigment jaune-orangé) et eumélanine (pigment marron-noir) par l'intermédiaire d'organites spécialisés, les mélanosomes. La phéomélanine n'a pas d'activité photoprotectrice à la différence de l'eumélanine cependant les deux types de pigments coexistent dans le même mélanocyte. Néanmoins, il existe des mélanosomes à eumélanine et des mélanosomes à phéomélanine, le ratio des deux types de mélanosomes conditionnant la pigmentation de la peau. La formation des mélanosomes, qui ont pour origine l'appareil de Golgi, se fait en plusieurs étapes (stade I à IV) et les mélanosomes matures (stade IV) sont acheminés par l'intermédiaire du cytosquelette vers les kératinocytes en contact avec les mélanocytes (Chap.2, sect.3.1.1-3). Au niveau de ces kératinocytes, les

mélanosomes s'organisent de façon périnucléaire où ils forment une sorte de "parapluie" qui va protégé (particulièrement l'eumélanine) les noyaux contre les rayonnements UV [¹³⁻¹⁵].

1.1.3. Les cellules de Langherans

Les cellules de Langherans représentent 3 à 5% des cellules de l'épiderme et constituent l'unité immunitaire de la peau. Leur densité, comprise entre 200 et 970 par mm², est maximale au niveau du visage et du cou. Ce sont des cellules dendritiques originaires de précurseurs hématopoïétiques issus de la moëlle osseuse. Localisées majoritairement entre les couches spinuse et granuleuse, elles émettent des dendrites entre les kératinocytes. De par leur mobilité, elles constituent des cellules phagocytaires capables de présenter des antigènes exogènes (bactéries) et endogènes (cellules transformées) aux lymphocytes T présents dans les ganglions lymphatiques. La présentation de ces antigènes, selon les lymphocytes T stimulés, initie les réactions de sensibilisation ou de tolérance à ces antigènes [^{16,17}].

1.1.4. Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel représentent la population cellulaire la moins abondante de l'épiderme. L'ontogenèse de ces cellules n'est pas clairement élucidée (crête neurale ou cellules souches épidermiques). Ce sont des cellules de nature neuroendocrine localisées dans les régions inter-folliculaires de la couche basale et associées aux terminaisons nerveuses qui émanent du derme et finissent dans la jonction dermo-épidermique. Les cellules de Merkel sont parfois organisées en amas et constituent alors des structures nommées corpuscules de Merkel. Ces cellules ont un rôle mécanorécepteur, elles possèdent également des fonctions inductives et trophiques sur les terminaisons nerveuses périphériques et les annexes cutanés [¹⁻³].

1.1.5. La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique (JDE) correspond à une lame basale complexe synthétisée par les kératinocytes de la couche basale et les fibroblastes du derme. Elle constitue un support mécanique permettant l'adhésion de l'épiderme au derme et assure les échanges entre les deux compartiments. La JDE est formée par l'association des hémidesmosomes présents à la membrane des kératinocytes de la couche basale à un réseau de fibres d'ancrages constituées majoritairement de Lamines, de collagènes de type IV et de collagènes de type VII [¹⁻³].

1.2. Le derme

Le derme correspond à un tissu conjonctif de soutien richement vascularisé et innervé. Il constitue une zone primordiale d'échanges (nutriments et déchets) avec l'épiderme qui est un tissu dépourvu de vascularisation. Le derme est constitué majoritairement de fibroblastes qui produisent une matrice extracellulaire riche en collagène de type I et III, en élastine, en fibrilline, fibronectine et en diverses protéoglycanes (acide hyaluronique, dermatane sulfate, chondroïtine sulfate) [18]. Il assure ainsi la compressibilité et l'élasticité de la peau et fournit une protection contre les chocs mécaniques. D'autres cellules tels que les dendrocytes et les mastocytes résident dans la couche dermique et participent au remaniement matriciel et à l'immunité [16,18]. Le derme est subdivisé en deux régions, le derme papillaire et le derme réticulaire. Le derme papillaire est la région superficielle en contact avec la JDE, elle constitue une matrice lâche constituée d'un réseau de fibres de collagènes peu dense associé à de fines fibres élastiques arrangées perpendiculairement à la JDE. Le derme papillaire forme des projections coniques nommées papilles dermiques qui augmentent la surface de contact avec l'épiderme et renforcent son adhésion. Le derme papillaire contient les terminaisons nerveuses (corpuscules tactiles) qui jouent un rôle dans la mécanoréception. Le derme réticulaire est formé d'un réseau de collagènes et de fibres élastiques beaucoup plus dense que celui du derme papillaire [1,3].

1.3. L'hypoderme

L'hypoderme représente la partie la plus profonde de la peau. Il est au même titre que le derme un tissu de soutien. Il est composé majoritairement d'adipocytes arrangés en lobules séparés par des septa de tissu conjonctivo-élastique par lesquels cheminent les réseaux vasculaires et nerveux émanant du muscle sous-jacent. L'hypoderme a un rôle crucial dans la thermorégulation, le stockage d'énergie et la protection contre les chocs mécaniques [1,3,5].

1.4. Les annexes cutanées

Les annexes cutanées correspondent à des structures épithéliales spécialisées qui sont connectées à l'épiderme de surface mais localisées majoritairement dans le derme et l'hypoderme. Ces annexes permettent la formation des phanères (ongles et poils), l'entretien de l'élasticité et l'hydratation des couches supérieures de l'épiderme et sont également associées à des fonctions métaboliques en participant notamment à la régulation de la température corporelle [4].

1.5. Follicule pileux et glandes sébacées

Les follicules pileux correspondent à des invaginations tubulaires de l'épiderme dans le derme profond qui sont spécialisées dans la formation de la tige pileuse. La production de cette structure est assurée par l'activité des kératinocytes et des mélanocytes contenus dans la zone matricielle du bulbe. Les cellules matricielles du bulbe proviennent du bulge qui est une niche importante de cellules souches kératinocytaires mais qui est également un lieu de résidence des mélanoblastes provenant des crêtes neurales [1,11,12]. La tige pileuse n'est pas permanente et son renouvellement est conditionné de façon cyclique. Ces cycles se traduisent par des variations de l'activité mitogénique et kératogénique des cellules matricielles. La phase anagène, la plus longue (3 à 8 ans selon le sexe) est une phase de croissance active de la tige pileuse [1].

Les phases catagène (3 semaines) et télogène (3 à 6 mois) correspondent respectivement à un blocage de l'activité et une atrophie de la zone matricielle. Une portion de muscle lisse (muscle arrecteur) est associée au follicule pileux et permet des mouvements de la tige pileuse (horripilation). Le derme supportant les follicules pileux est richement innervé ce qui contribue aux fonctions sensorielles associées aux follicules pileux [1,3,4].

Les glandes sébacées correspondent à des glandes exocrines de forme tubulo-alvéolaire dont la partie sécrétrice se situe dans le derme et la partie excrétrice débouche dans l'infundibulum du follicule pileux. Les sébocytes constituant cette glande forment le sébum qui est une substance lipidique contribuant à l'imperméabilisation et la flexibilité de la couche cornée [1,3].

1.6. Les glandes sudoripares

Les glandes sudoripares sont des glandes exocrines tubulaires dont la partie sécrétoire se situe dans le derme profond ou dans la partie superficielle de l'hypoderme et la partie excrétoire débouche au niveau des pores de la peau. Ces structures épithéliales sont classées en deux types ; les glandes eccrines et les glandes apocrines. Les glandes eccrines recouvrent tout le corps et sont particulièrement abondantes dans les régions palmo-plantaires, les aisselles ou le front. Elles sont impliquées dans la régulation de la température du corps en produisant de la sueur. Les glandes apocrines sont rares chez l'Homme, elles sont invariablement associées aux follicules pileux (aisselles, mamelons). Elles secrètent une substance laiteuse apparentée à des phéromones [1-3].

2. Les UV et leurs effets carcinogènes

Les sources de rayonnements ultraviolets (UV) auxquels la peau peut être exposée sont multiples. La source majeure de rayonnement est d'origine solaire mais il existe également des sources "artificielles" utilisées à des fins cosmétiques ou thérapeutiques. Quelle que soit la source, les UV selon leur nature et leur intensité atteignent les différentes cellules de la peau et sont à l'origine de dommages à l'ADN qui peuvent conduire à des mutations et participer à la transformation maligne des cellules.

2.1. Nature des UV

Le rayonnement solaire émet un spectre de radiation électromagnétique continu qui comprend ; le spectre des ultraviolets (45%), du visible (5%), et des infra-rouges (50%). Le spectre UV est subdivisé en trois parties selon la longueur d'onde des différents UV ; UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) et UVC (100-280 nm) [¹⁹⁻²¹] (**Figure 4**).

Au niveau physique, l'énergie des différents types d'UV est inversement proportionnelle à leur longueur d'ondes, ainsi à une faible longueur d'ondes est associée une forte énergie (**Figure 4**). Plus les rayons ont une forte énergie et plus ils sont filtrés par la couche d'ozone. Aussi, Tous les types d'UV n'atteignent pas la surface terrestre ; les UVA traversent complètement la couche d'ozone à la différence des UVC qui sont complètement bloqués ou des UVB qui sont arrêtés à 90-94%. Ainsi, hormis des zones géographiques particulières (haute altitude, trou dans la couche d'ozone), la peau humaine est exposée à environ 94% d'UVA et 6% d'UVB [¹⁹].

Les doses d'UV solaires auxquelles les hommes sont exposés sont variables ; elles augmentent avec l'altitude et les faibles latitudes, elles varient avec les saisons et les pratiques professionnelles extérieures. En fonction de ces paramètres, les doses cumulées annuelles pour les personnes travaillant en intérieur sont : de 10 à 20 kJ/m^2 pour les Européens, 20-30 kJ/m^2 pour les Américains et 20-50 kJ/m^2 pour les Australiens. Ces doses augmentent de 30% pendant les congés et, les personnes travaillant en extérieur reçoivent 2 à 3 fois plus d'UV que les personnes travaillant en intérieur. Il est à noter qu'une dose comprise entre 200-250 J/m^2 est suffisante pour induire un érythème ou "coup de soleil" chez les personnes à peau claire (phototype I et II) et que la fréquence de ces coups de soleil particulièrement dans la petite enfance est corrélée à un risque élevé de développement de cancers cutanés [²¹⁻²³].

Hormis le soleil, la peau peut-être exposée à des sources artificiels d'UV. Ces sources sont le plus souvent des lampes avec différents filtres contenant classiquement des vapeurs de mercure. Le mercure excité par le courant électrique retourne à son état normal en dispersant de l'énergie sous forme d'UV, les filtres permettent ensuite la sélection d'un type d'UV ou d'un mélange d'UV en particulier. En cosmétique, on retrouve ces lampes dans les cabines de bronzage qui sont utilisées pour activer la pigmentation après exposition à des UVA principalement.

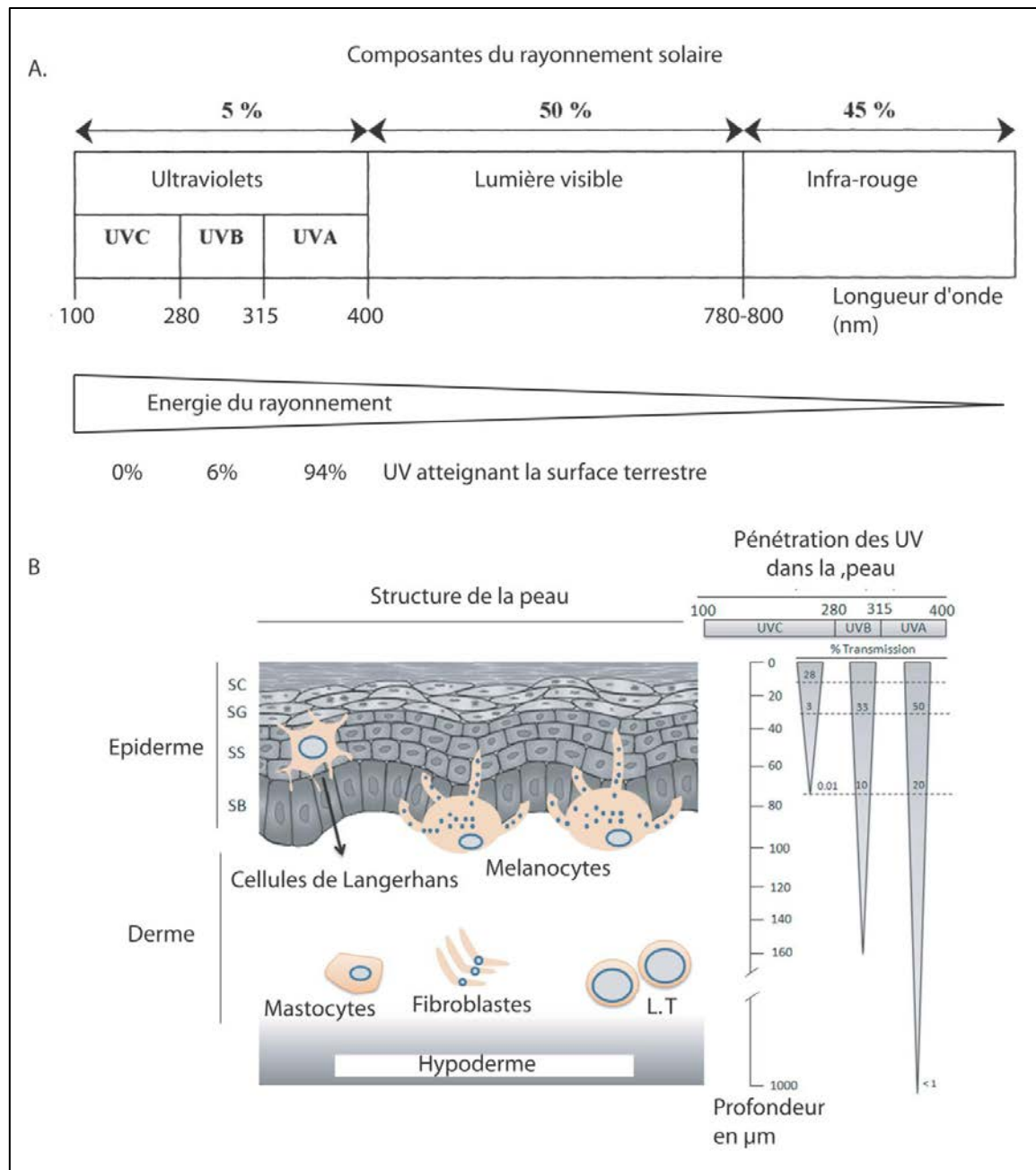


Figure 4 : Spectre électromagnétique et pénétration des UV solaires dans la peau.

A. Spectre électromagnétique solaire (Schéma adapté à partir de réf. [19,20]). B. Niveau potentiel de pénétration des UV dans la peau. Il est à noter que les UVC ne traversent pas la couche d'ozone, mais leur pénétration est indiquée du fait de leur utilisation dans le domaine de la recherche fondamentale (Schéma adapté à partir de réf. [24]).

Ces lampes sont également utilisées à des fins thérapeutiques en exploitant les propriétés cytotoxiques et immunosuppressives des UV combinées ou non avec des agents sensibilisants comme les psoralènes (thérapies de type PUVA/UVB/PDT). Ces types de traitements sont utilisés dans le cadre de maladies de peaux aiguës telles que le psoriasis, l'eczéma ou le vitiligo. S'ils peuvent s'avérer efficaces, ces traitements augmentent le risque de développement de cancers cutanés [²⁵⁻²⁷].

2.2. Dommages à l'ADN liés à l'exposition UV et mutagénicité

Les UV altèrent les cellules cutanées et leur environnement matriciel en réagissant et en modifiant les structures moléculaires de leurs composants de manière directe et/ou indirecte. La nature de ces réactions va dépendre du spectre d'absorption des molécules cibles et implique une réactivité différentielle selon le type d'UV. Parmi les dommages induits par les UV, les lésions à l'ADN constituent une source mutagénique primordiale dans le développement des cancers cutanés.

2.2.1. Les UVA

Les UVA sont très peu absorbés par les constituants cellulaires et structuraux composant la peau [²⁸]. Aussi, ils sont capables de pénétrer dans les couches profondes du derme [²⁹]. Ils sont considérés comme la composante oxydative majeure du spectre UV solaire et leurs effets délétères sont particulièrement associés au vieillissement cutané prématuré [³⁰]. Leur implication dans la carcinogenèse cutanée est encore discutée par rapport à l'impact bien établi des UVB [³¹].

2.2.1.1. Mécanisme de photosensibilisation et espèces réactive de l'oxygène (ROS)

Les UVA agissent par des réactions de photo-sensibilisation en faisant intervenir des chromophores qui jouent le rôle de photo-sensibilisateurs. Ces photo-sensibilisateurs sont des molécules comme; les cytochromes, la flavine, l'hème, le NAD(P)H et les porphyrines. Les UVA vont être absorbés par ces chromophores et alors les placer dans un état excité (état triplet). Ces derniers retournent à leurs états fondamentaux en interagissant directement avec d'autres molécules (acides nucléiques, protéines, lipides) par des réactions de transfert d'électron ou d'abstraction d'hydrogène (oxydation de type I) ou, en réagissant avec l'oxygène moléculaire (oxydation de type II) (**Figure 5A**). Ces réactions aboutissent à la formation de composés radicalaires et produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) tels que l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [³²]. D'autres réactions en chaîne peuvent se produire comme, la dismutation spontanée ou enzymatique (superoxyde dismutase)

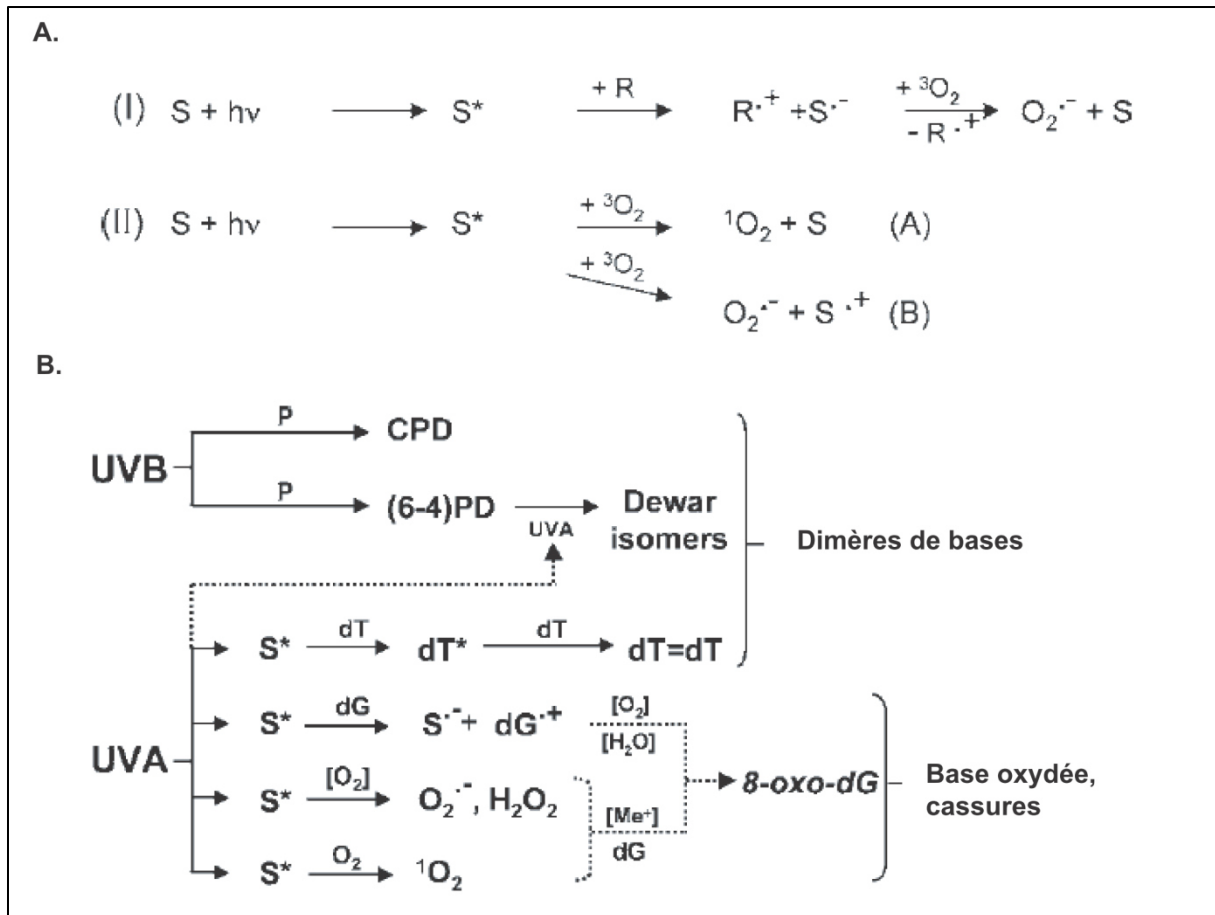


Figure 5 : Mécanismes généraux de photosensibilisation et formation de 8-oxodG

A. Mécanisme général de photo-sensibilisation. Une molécule endogène se comportant comme un sensibilisateur (S) est excitée par des photos incidents et transfère directement l'énergie accumulée à une autre molécule acceptrice (R, réaction de type I ou 3O_2 , réaction de type II). Ces réactions produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont; l'oxygène singulé (1O_2) et l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). B. Formation de lésion à l'ADN de type 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxodG) après exposition aux UVA. La 8-oxodG peut être obtenue directement par une réaction de type I ou par l'intermédiaire des ROS générées par une réaction de type II. Les UVA peuvent également former des dimères de thymines par une réaction de type I à partir d'un chromophore situé à proximité de l'ADN. Ils contribuent également à l'isomérisation des 6-4PP produits par les UVB en isomères de Dewar (Schémas adaptés à partir de réf.[³²]).

de l'anion superoxyde qui génère du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou la réaction de ce dernier avec le fer (réaction de Fenton) qui produit des radicaux hydroxyles (OH^\cdot). Les ROS générés peuvent attaquer potentiellement tous les composants cellulaires dont l'ADN [28,33].

Plusieurs types de dommages à l'ADN peuvent être générés en conséquence aux réactions de photo-oxydations ; des cassures simples brins [34-36], doubles brins [37] ou même des liaisons ADN-protéine ou ADN-lipides [28,36]. Notre attention se focalisera ici sur les modifications majeures des bases et leurs potentiels mutagéniques.

2.2.1.2. Dommages à l'ADN de type 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-Gua)

Les acides nucléiques sont particulièrement sensibles aux réactions d'oxydation. Parmi les quatre nucléotides, la guanine est la base la plus réactive de par son potentiel d'ionisation le plus faible (**Figure 5B et 6**). En réponse aux UVA, la guanine peut être modifiée par une réaction de type I en radical cation de guanine qui subit successivement une hydratation et une oxydation qui génèrent la base modifiée 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-Gua). Cette base modifiée peut être également générée par réaction de l'oxygène singulet 1O_2 ou de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) produits à la suite d'une réaction de type II [32].

Les dommages de type 8-oxo-Gua n'induisent pas de déformation de l'ADN et n'affectent pas la progression des polymérases répliquatives et transcriptionnelles [38,39]. Pendant la réplication de l'ADN particulièrement, la 8-oxo-Gua peut-être appariée avec une adénine et ce mésappariement peut conduire au cycle de réplication suivant à des transversions de type $G \rightarrow T$ potentiellement mutagéniques (**Figure 7A**) [40]. De la même manière que sur la séquence d'ADN, le pool de guanine libre peut également être modifié et l'insertion de 8-oxo-GuaGTP à l'opposé d'une adénine peut conduire à des transversions de type $T \rightarrow G$ (**Figure 7A**) [41]. A l'inverse des transversions $G \rightarrow T$, les transitions $T \rightarrow G$ induites par les UVA ont été retrouvées dans des gènes cruciaux comme *TP53* dans des modèles expérimentaux de peau humaine reconstruite [42].

2.2.1.3. Dommages à l'ADN de type dimère de cyclobutane pyrimide (CPD)

Longtemps associés aux rayons UVB/UVC, les UVA pourraient également être responsables de la formation de lésions à l'ADN de type CPD. Ces lésions correspondent à la liaison covalente de deux pyrimidines adjacentes (Chap.1, sect.2.2.2.1, **Figure 6**). A la différence de l'absorption directe des UV par les bases pyrimidiques comme c'est le cas pour les UVB ou les UVC, les UVA seraient à l'origine de CPD par un mécanisme de photo-sensibilisation de type I par un

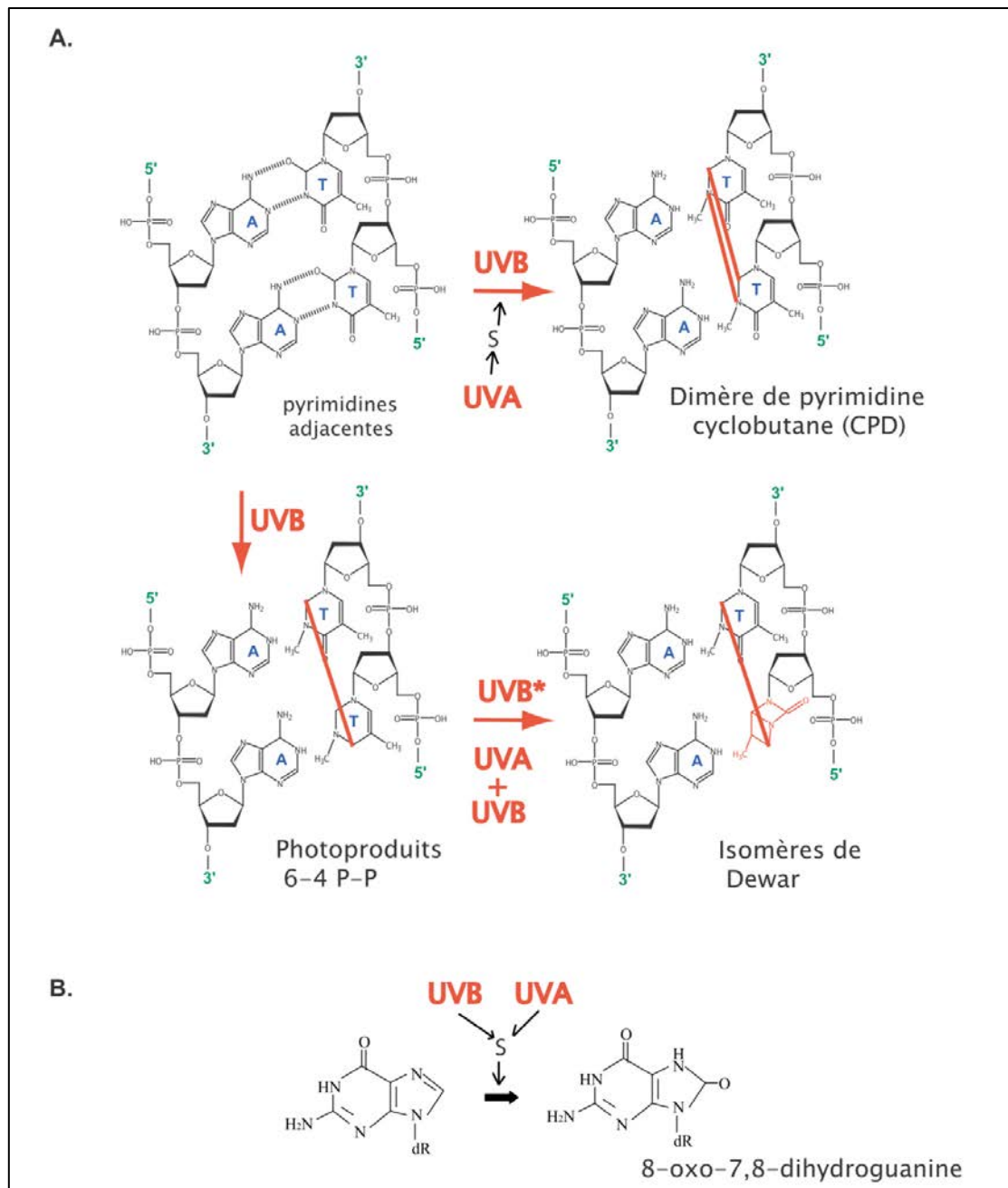


Figure 6 : Dommages à l'ADN formés après l'exposition UV.

A. Les UVB agissent directement sur les bases pyrimidiques adjacentes et engendrent, par la formation d'une double liaison entre les bases, des dimères de cyclobutane pyrimidine (CPD) ou, d'une simple liaison, des 6-4 pyrimidine pyrimidone (6-4PP). Ces derniers sont réarrangés en isomères de Dewar sous l'action combinée des UVA et des UVB ou d'UVB de faible énergie (UVB*). Les CPD peuvent être obtenues en réponse à l'exposition UVA par un mécanisme de photo-oxydation. B. La guanine peut être modifiée en 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-OxoGua) par des réactions de photo-oxydations mettant en jeu les UVA ou les UVB. (S= sensibilisateur).

chromophore à proximité de l'ADN [32,36]. En réponse aux UVA, la formation des CPD par rapport aux 8-oxo-Gua serait même trois fois plus importante dans les cellules en culture [34-36]. Néanmoins, La quantité de CPD après exposition UVA resterait 1000 à 10000 fois moins importante qu'avec les UVB et engagerait principalement des dimères de thymine [35,43,44]. La présence de ce type de dommages, non décelée de façon unanime, reste contradictoire et alimente la controverse sur le potentiel carcinogénique des UVA [31].

2.2.2. Les UVB

Les UVB solaires ont des longueurs d'ondes comprises entre 280 et 320nm, aussi les chromophores cellulaires qui absorbent directement dans ces longueurs d'ondes sont ; les acides nucléiques, les coenzymes NADH et NADPH, les groupements héminiques, les porphyrines, les quinones, les flavines, les caroténoïdes, le 7-déhydrocholesterol, l'acide urocanique, et les acides aminés aromatiques [32]. Le spectre d'absorption des UVB explique majoritairement le fait qu'à la différence des UVA, leurs effets se concentrent dans l'épiderme. Aussi seulement 10% des rayons UVB sont capables d'atteindre le derme papillaire [28,29].

2.2.2.1. Dommages à l'ADN de type dimère de bases ; dimère de cyclobutane pyrimide (CPD), 6-4 pyrimidine pyrimidone (6-4PP) et isomères de Dewar

Les UVB réagissent majoritairement avec les acides nucléiques dont le pic d'absorption maximale se situe à 260 nm. Cette absorption d'énergie par les cycles aromatiques des bases adjacentes est suffisante à la création de liaisons covalentes entre ces bases et la formation de dimère. Dans les cellules irradiées par les UV, les liaisons entre bases pyrimidiques adjacentes constituent les réactions les plus fréquentes. La dimérisation des bases puriques entre elles ou de bases puriques et pyrimidiques peuvent également se produire mais constituent des événements rares [28,36].

Lors d'une exposition UVB, les séquences de type TT et TC seraient les plus photo-réactives en comparaison avec les séquences de type CC ou CT [36,43]. D'autres part, Les régions riches en îlots CpG sont particulièrement réactives aux UVB de par l'augmentation de la longueur d'onde du spectre d'absorption de la base cytosine qui favorise la formation de dimère de base [45-47].

Les CPD sont établis par la cyclo-addition des doubles liaisons portées par les atomes de carbone C5 et C6 de deux bases pyrimidique voisines alors qu'une simple liaison reliant les carbones C6 et C4 forme les 6-4PP (**Figure 6A**). Les 6-4PP peuvent subir une photo-isomérisation en d'autres types de lésions que sont les isomères de Dewar. Les isomères de Dewar sont formés par une liaison covalente entre l'azote en N3 et le carbone en C6 de la base adjacente [36]. Cette réaction est

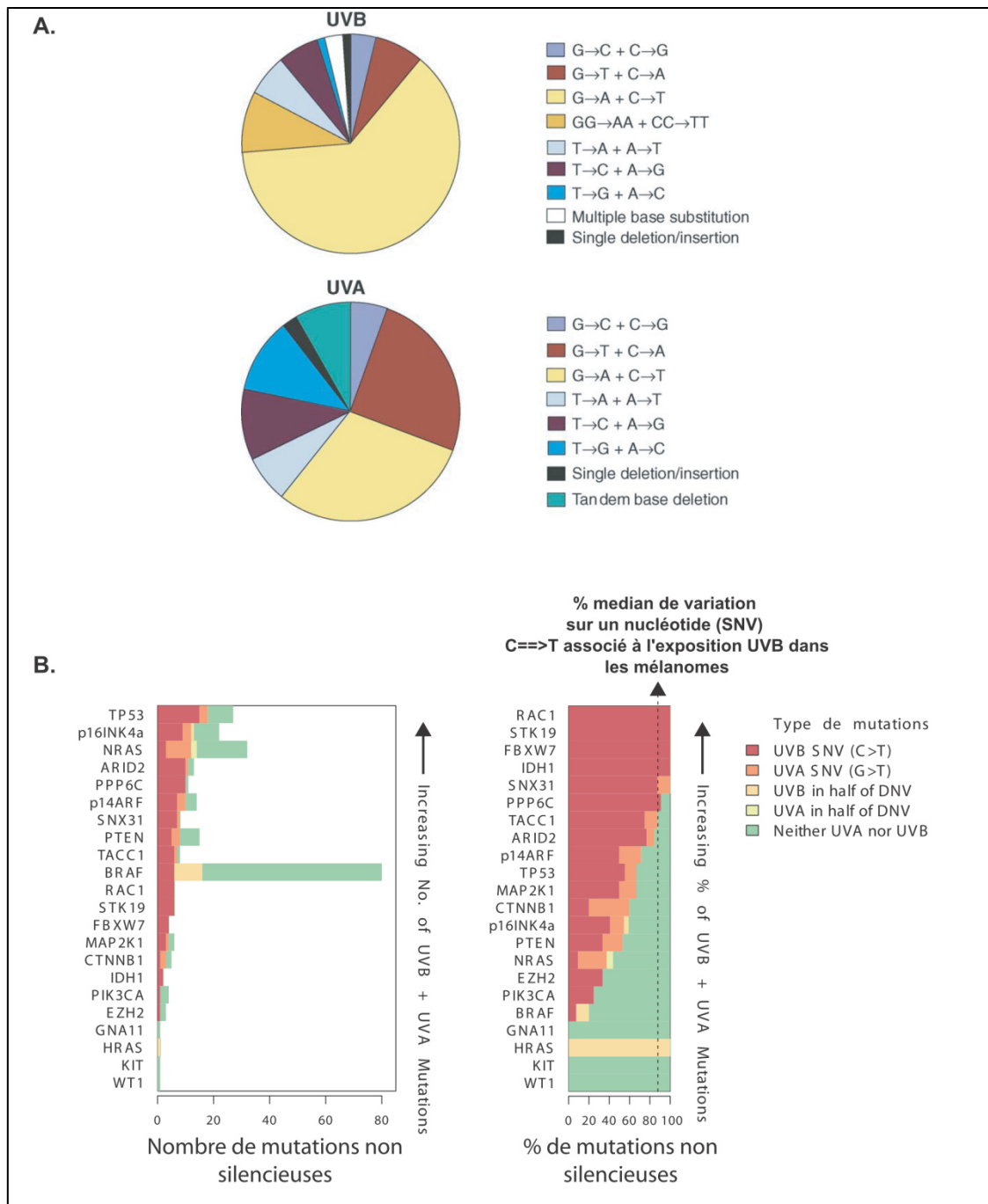


Figure 7 : Spectres mutationnels associés à l'exposition UV.

A. Spectres mutationnels des différents types d'UV quantifiés à partir du séquençage d'une construction reportrice (plasmide *c/l*) introduite dans des fibroblastes issus d'embryons murins irradiés soit par des UVA ou des UVB. Les UVB impliquent majoritairement des transitions de type C→T ou moins fréquemment mais plus spécifiquement des transitions de type CC→TT. Dans le cas des UVA, les transitions CC→TT sont absentes, alors que les transitions G→A et G→T sont enrichies (Tiré de réf.[^{45,46}]). B. Abondance des signatures UV de type C→T et G→T dans les gènes impliqués dans le mélanome cutané humain (Données extraites et adaptées à partir de réf.[⁴⁸]).

particulièrement observée lors d'exposition UVB de faible énergie (320nm) ou lors de combinaison UVA et UVB [^{35,36}] (**Figure 6A**).

Dans les cellules irradiées par les UVB, les lésions produites de façon majoritaires sont les CPD. Elles seraient entre 3 et 8 fois plus nombreuses que les lésions de type 6-4PP [^{35,44}]. En revanche, les lésions de type isomères de Dewar sont les lésions les moins fréquentes, elles seraient 3 à 8 fois moins abondantes que les 6-4PP selon respectivement l'utilisation d'un mélange UVA+UVB ou d'UVB seuls [⁴⁴].

Les CPD, les 6-4PP et les isomères de Dewar induisent des distorsions de l'hélice d'ADN qui bloquent la progression des polymérases répliquatives et transcriptionnelles. Le blocage de la transcription, notamment, est un signal important pour activer la voie de réparation de l'ADN par excision de nucléotide (Chap.2, sect.2.3.1-2) qui constitue le mécanisme majoritaire de réparation de ce type de lésions. Aussi, les distorsions de l'hélice d'ADN induites par les CPD et les isomères de Dewar, étant moins importantes que les 6-4PP expliquent leur réparation plus lente [^{44,49}].

L'abondance et la vitesse lente de réparation des CPD font que ces lésions sont les plus carcinogènes. Dans les cellules de mammifère, il a été montré que les CPD pouvaient être responsable de 80% des mutations induites par les UVB [⁴⁶]. Particulièrement, les CPD impliquant des cytosines sont instables et sont désaminés ce qui génère à la place des uraciles [³⁶]. Ces bases, non instructionnelles, sont remplacées par des adénines par des polymérases particulières par un mécanisme de synthèse translésionnelle [⁴⁷]. Lorsque la cytosine est méthylée, sa désamination aboutie à la formation de thymine. Dans les deux cas, après la réplication de l'ADN cela entraîne des transitions de type C→T ou CC→TT. En ce qui concerne les CPD impliquant des dimères de thymine, ces modifications engendrent une restitution des bases d'origines après la réplication d'où leur faible mutagénicité [^{45,47}]. Il est à noter que les transitions de type C→T ou CC→TT sont fréquemment retrouvées dans les cancers cutanés, dont les carcinomes particulièrement. Ces transitions font partie des signatures UV les plus caractéristiques (**Figure 7 A**). Aussi, les zones de l'ADN présentant des tandems de base pyrimidiques (CT, CC) ou des îlots CpG méthylés sont propices aux mutations et sont qualifiés de "points chauds" [⁵⁰⁻⁵²].

2.2.2.2. Dommages à l'ADN de type 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-Gua)

Longtemps restreints aux UVA, il a été montré que les UVB pouvaient également induire des 8-oxo-Gua dans la peau humaine [⁴³]. Le mécanisme de production de ces 8-oxo-Gua ferait vraisemblablement intervenir une réaction de photo-sensibilisation (**Figure 5A et 6B**). Dans des cellules isolées, la quantité de lésions de type 8-oxo-Gua pourrait être 100 fois plus importante que les UVA mais resterait largement minoritaire par rapport à la quantité de lésions de type CPD générée [³⁴]. Bien que minoritaire, il a été montré dans le modèle murin que cette composante oxydative des UVB pourrait participer à la carcinogenèse cutanée [⁵³].

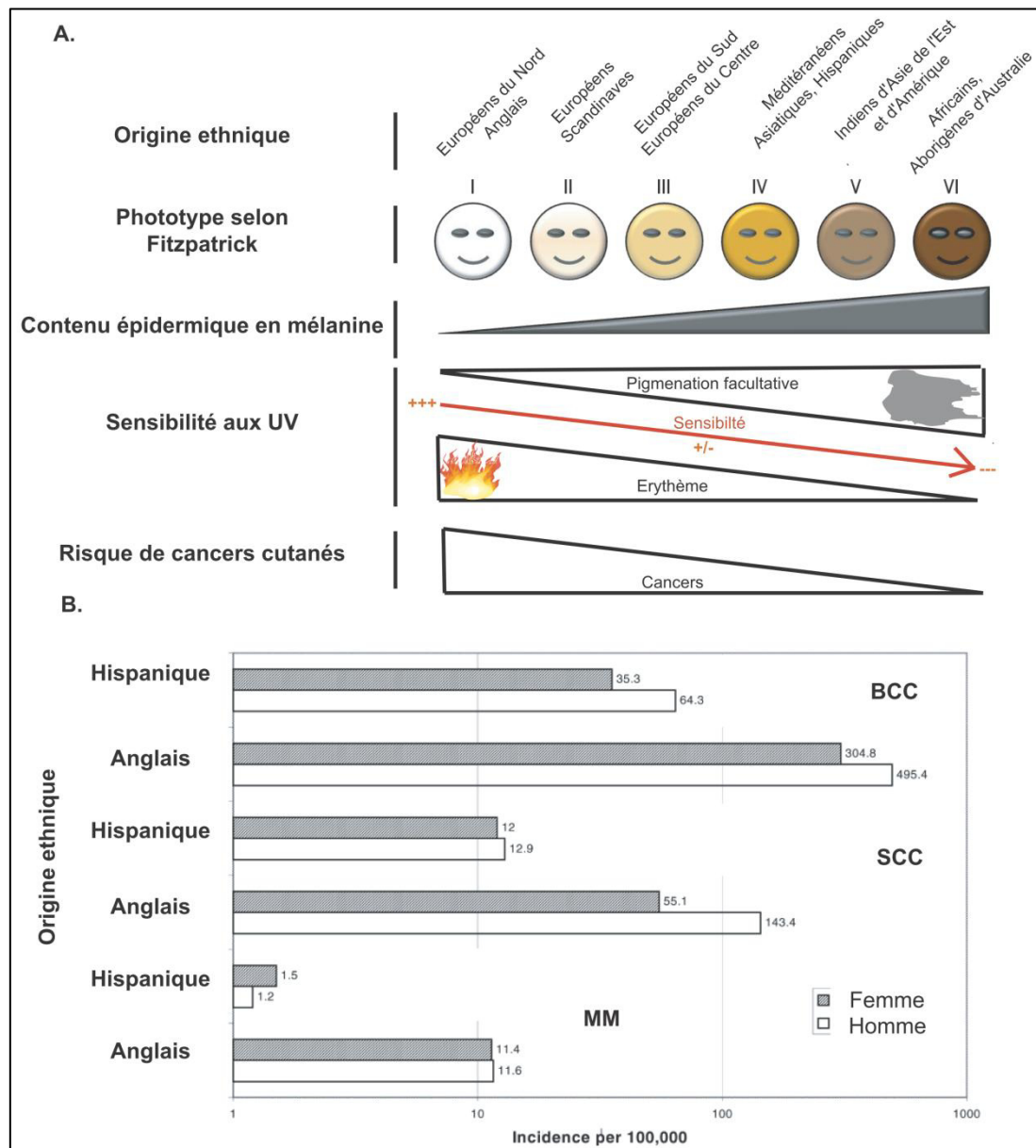


Figure 8 : Phototypes et développement des cancers cutanés liés à l'exposition UV.

A. Représentation du risque de développement de cancers cutanés en fonction du phototype selon la classification de Fitzpatrick. Les personnes originaires d'Europe du Nord qui ont la peau très claire (Phototype I) développent systématiquement des érythèmes et ne pigmentent pas à la différence des Africains (phototype VI) lors de l'exposition UV solaire. Chez ces personnes de la même manière, le risque de développement de cancers cutanés liés à l'exposition solaire est plus important et met en évidence l'effet photo-protecteur de la pigmentation (reconstruit et adapté à partir de réf. [54]). B. Résultats d'une étude montrant à titre d'exemple l'influence du phototype sur l'incidence (standardisée à l'âge) des cancers cutanés aux Etats-Unis dans les années 1980. On peut noter que les personnes de phototype les plus claires développent entre 5 et 10 fois plus de cancers cutanés (Tiré et adapté de réf. [55]).

2.2.3. Les UVC

Les UVC ne constituent pas des rayonnements physiologiques dans la mesure où ils sont majoritairement stoppés par la couche d'ozone. Leurs effets sont presque comparables à ceux des UVB pour des temps d'expositions très réduits de part leurs fortes énergies. Cet avantage fait qu'ils restent très utilisés dans le domaine photobiologique. A la différence des UVB, ils induisent moins de CPD et plus de 6-4PP. Ils ne sont cependant pas capables de générer d'isomères de Dewar [44].

Enfin, il est important de retenir que les UV affectent la stabilité génomique en modifiant de manière directe, ou indirecte (espèces réactives de l'oxygène produites) la séquence de l'ADN. Les conséquences de cette réactivité sont illustrées par la présence de signatures générales ou spécifiques aux différents types UV sur l'ADN génomique (**Figure 7A**). Bien que les UVA puissent contribuer à cette instabilité génomique, les UVB s'avèrent être les rayons les plus mutagéniques.

Après avoir présenté les effets mutagéniques des UV en précisant l'impact de leurs différentes longueurs d'ondes, nous aborderons dans la partie suivante les cancers cutanés qui y sont associés. Cette présentation décrira les différents cancers cutanés mais également les gènes les plus fréquemment mutés qui sont associés à leurs développements.

3. Les cancers cutanés associés à l'exposition UV

Les cancers cutanés regroupent majoritairement des carcinomes et des mélanomes qui dérivent respectivement de la transformation maligne des kératinocytes et des mélanocytes. Ces cancers représentent des pathologies en forte expansion. Pour exemple, l'OMS a enregistré que depuis ces dernières décennies, un cancer diagnostiqué sur trois correspondait à un cancer cutané. Dans ce constat, l'OMS reporte également un nombre annuel de cancers comprenant entre 2 et 3 millions de carcinomes et 132 000 mélanomes dans le monde [56,57].

En dehors de facteurs génétiques prédisposant aux cancers cutanés (pour exemples le Xeroderma Pigmentosum, XP, ou l'Albinisme Oculo-cutané, OA), l'exposition solaire place les UV depuis longtemps comme un facteur de risque majeur du développement de ces cancers. Ainsi, l'intensité de l'ensoleillement, le type d'exposition (soutenue ou intermittente), le phototype et l'association de plusieurs épisodes d'érythèmes durant la petite enfance influencent fortement le risque de développer les différents cancers cutanés [22,23,58-61]. Les personnes particulièrement à risque sont les sujets de phototype les plus claires (I et II) fortement enclin à développer un érythème et vivant dans les basses latitudes, comme les Européens du Nord ou les Australiens non-Aborigènes [54] (**Figure 8A et B**).

3.1. Les UV des carcinogènes complets

Les UV constituent des carcinogènes complets de par leurs implications à la fois dans l'initiation, la promotion et la progression de cellules cancéreuses au niveau cutané [62-68]. Ainsi, selon la théorie de progression séquentielle et dans un contexte de réparation peu fidèle (réparation translesionnelle), des mutations primaires apparaissant dans des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs à la suite d'une exposition initiale aux UV peuvent conduire à la formation de lésions bénignes pré-néoplasiques. A ces mutations primaires peuvent s'associer, après exposition UV répétée, des mutations secondaires qui vont favoriser la transformation maligne des cellules cutanées. Ainsi, la sélection de clones hyperproliférants, le plus souvent dans des conditions de résistance à l'apoptose, favorisent l'instabilité génomique et la transformation des kératinocytes et des mélanocytes [45,47,69-71]. Nos connaissances sur l'implication des UV dans la carcinogenèse cutanée ont été fortement renforcées par l'analyse des tumeurs des patients atteints de Xeroderma pigmentosum (XP). Ces patients, hypersensibles aux UV, ont une fréquence supérieure de 1000 à 2000 fois plus importante que les patients non XP de développer des carcinomes et des mélanomes [50,52,61,72]. L'étude des tumeurs de ces patients, particulièrement les carcinomes, montrent de façon générale une fréquence élevée de mutations associées à l'exposition UV [50-52,73,74]. Ces mutations apparaissent, très précocement et de façon récurrente, particulièrement dans les régions riches en pyrimidine et peuvent affecter la fonctionnalité de plusieurs oncogènes et suppresseurs de tumeur. De façon intéressante, ces mêmes mutations, à des fréquences moins élevées, sont également retrouvées dans les cancers cutanés sporadiques des patients non XP et attestent de l'effet carcinogène des UV [50,52,61,72,73,75-80].

Bien que l'association épidémiologique entre le mélanome et l'exposition UV soit clairement établie [22,23], le spectre des mutations retrouvées sur les gènes les plus fréquemment mutés dans ce cancer, et qualifiées de mutations "primaires", n'arborent que très rarement des mutations caractéristiques de l'effet direct des UV (**Figure 7B**) [58,81,82]. Cette contradiction a amené à proposer d'autres types de mécanismes plus indirectes, particulièrement le stress oxydant généré par l'exposition UV, dans la genèse de ces mutations dites "primaires" [58,82,83]. Néanmoins, plusieurs études suggèrent que le développement et la progression du mélanome dépendent vraisemblablement de l'effet synergique de plusieurs mutations dans des gènes dit "secondaires" qui eux arborent clairement des signatures UV (**Figure 7B**) [48,70,84].

La genèse et le développement des cancers liés à l'exposition UV impliquent des modifications génétiques qui incluent ; des mutations ponctuelles, des délétions, des amplifications mais également des modifications épigénétiques qui contribuent toutes de façon importante à la carcinogenèse cutanée [45,47,85]. Ici, nous focaliserons notre attention sur les gènes présentant des mutations ponctuelles associées à l'exposition UV (**Figure 7 et Tableau I**).

3.2. Les différents cancers cutanés

Les différents cancers liés à l'exposition UV comprennent le plus souvent des cancers qui sont généralement de bon pronostic comme les carcinomes. A l'inverse, s'ils sont beaucoup moins fréquents, les mélanomes sont des cancers associés aux effets délétères des radiations UV qui ne présentent aujourd'hui aucunes alternatives thérapeutiques totalement efficaces.

3.2.1. Les carcinomes

Les carcinomes, qui comprennent les carcinomes basocellulaires (BCC) et spinocellulaires (ou épidermoïdes) (SCC), sont les cancers cutanés les plus fréquents (90 à 97% des cancers). Les BCC sont beaucoup plus importants que les SCC (ratio 4 :1) mais ont des capacités métastatiques 10 fois moins importantes [55,56,58,86]. Les BCC et les SCC sont retrouvés de façon majeure sur les régions photo-exposées de façon chronique, particulièrement le cou et la face ou, de façon intermittente comme le dos, les avant-bras ou le bas des jambes (selon le sexe) [22,23,55-57,87].

3.2.1.1. Le carcinome basocellulaire (BCC)

Les BCC correspondent à 80-90% des cancers cutanés [56,58]. Ce sont des tumeurs avec une croissance lente, localisées et rarement métastatiques (**Figure 9 A**). Ces cancers ont une fréquence importante au dessus de 55 ans, avec un pic au dessus de 70 ans [55,86,88]. Les BCC peuvent dériver des kératinocytes de la couche basale interfolliculaire ou du follicule pileux. Dans les BCC, macroscopiquement, les lésions pré-néoplasiques ne sont pas encore clairement identifiées. Au stade malin, ils se présentent histologiquement sous forme de nodules le plus souvent plants de différentes formes (ulcérant, superficiel, morphéiforme, infiltrant et/ou pigmenté). Les nodules ulcéchants d'aspect translucide et perlé sont caractéristiques et représentent 45 à 60% des BCC [86,89,90].

3.2.1.2. Le carcinome squameux ou spinocellulaire (SCC)

Les SCC sont retrouvés sur presque les mêmes régions anatomiques que les BCC mais à des fréquences différentes (fréquence plus élevée sur le bas des jambes ou les mains par exemples). Ces cancers, de croissance lente, sont plus fréquemment métastatiques (1-2% des SCC) que les BCC mais sont également moins fréquents (15-20% des cancers cutanés) [55,56,58]. De même que le BCC, l'incidence des SCC est très importante chez les personnes âgées [86,88]. Les SCC se développent à partir des kératinocytes des couches basale et granulaire qui forment des lésions pré-néoplasiques bénignes, les kératoses actiniques (KA). Au stade néoplasique, ils se présentent sous forme de nodules érythémateux à bord élevé [58,86] (**Figure 9A**).

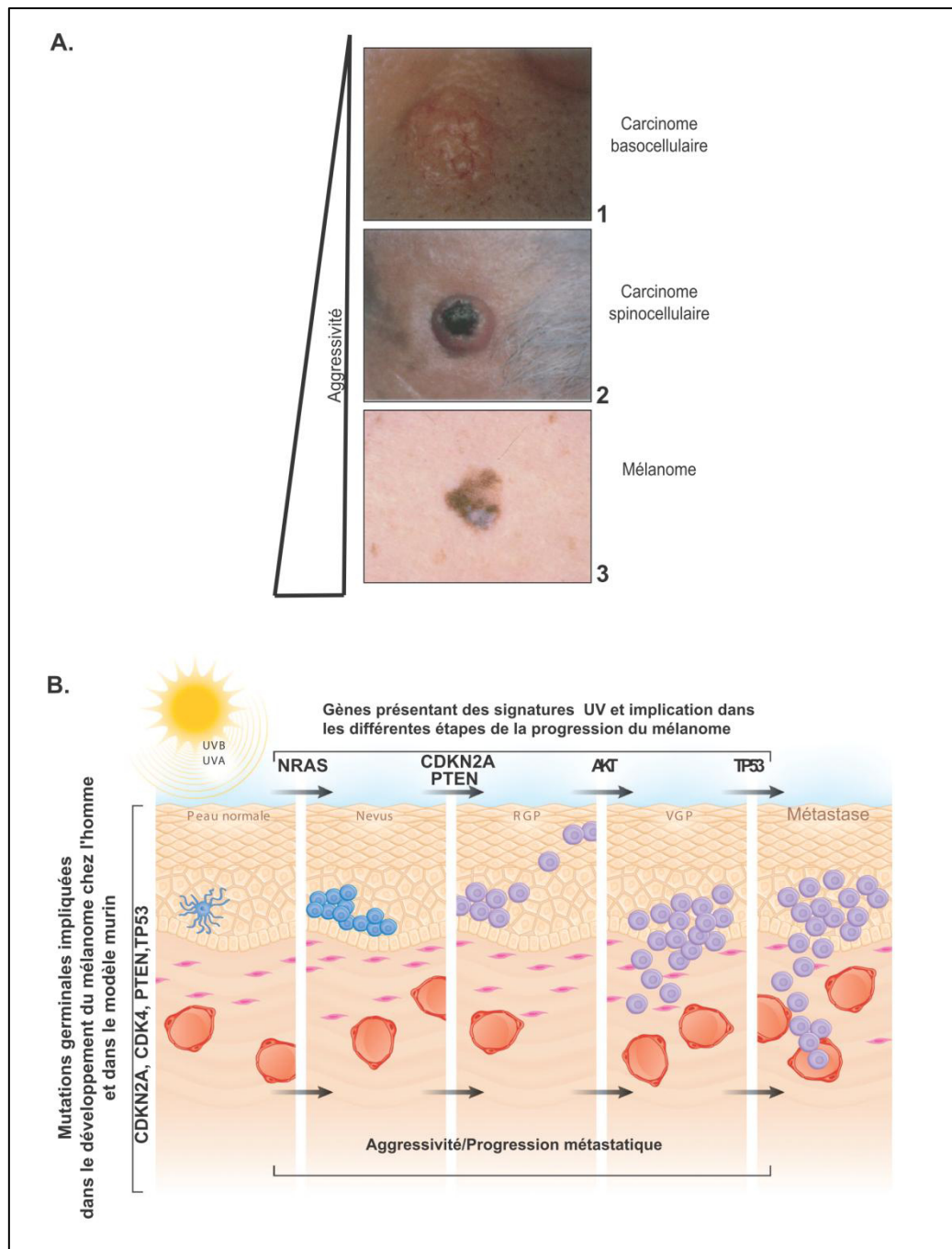


Figure 9 : Cancers cutanés liés à l'exposition UV et mutations associés à l'exposition UV dans la progression du mélanome.

A. Aspect macroscopique du carcinome basocellulaire (1), du carcinome spinocellulaire (2) et du mélanome cutané (3). L'ensemble des tumeurs est situé sur la face (Tirés de réf. [86] pour les photos 1 et 2 et de réf. [59] pour la photo 3). B. Schéma illustrant la progression du mélanome et des gènes présentant des signatures UV impliqués dans ce cancer chez l'Homme et la souris. Il est à noter que le moment précis où interviennent les gènes dérégulés est largement tiré des études sur le modèle murin. RGP=phase de croissance horizontale, VGP=phase de croissance verticale. (Illustration tirée et remaniée à partir de réf. [85]).

3.2.2. Le mélanome (MM)

Le mélanome est le moins fréquent des cancers cutanés (1-3%), il croît rapidement et il est doté d'un potentiel métastatique très important. Il est rare chez l'enfant et contrairement aux carcinomes peut apparaître avant l'âge de 50 ans. C'est un cancer redoutable qui entraîne une survie rarement supérieure à 5 ans au stade métastatique [56,57,91]. Son incidence est particulièrement corrélée au phototype des individus et leur sensibilité aux UV. La classification de Fitzpatrick basée sur cette sensibilité définit 6 phototypes dont le risque de mélanome est inversement proportionnel à l'aptitude à pigmenter et la rareté d'apparition de l'érythème (**Figure 8A**). Ainsi, l'incidence des mélanomes associés à l'exposition UV est entre 10 et 16 fois plus importante chez les phototypes caucasiens (phototype I et II) par rapport aux non-caucasiens (phototype IV à VI) (**Figure 8B**) [22,23,54,55,92-94].

En comparaison avec les carcinomes, les mélanomes ne seraient pas dus à des doses d'UV modérées qui sont accumulées à long terme sur les régions du corps fréquemment découvertes. Les études épidémiologiques suggèrent que la genèse des mélanomes est particulièrement associée à des expositions intermittentes intenses des zones du corps habituellement couvertes avec des épisodes de coups de soleil douloureux durant l'enfance. Ainsi, chez les phototypes les plus claires (I et II), il a été estimé qu'un coup de soleil dans la petite enfance doublait le risque de développer un mélanome. Anatomiquement, les mélanomes apparaissent le plus fréquemment sur le tronc chez l'homme et le bas des jambes chez la femme [22,23,54,95].

Le mélanome est issu de la transformation des mélanocytes de la couche basale de l'épiderme. Dans 80% des cas, le mélanome se manifeste par l'apparition d'une tâche pigmentée, semblable à un grain de beauté, le naevus ou mole et dans 20% des cas par la modification de grains de beauté préexistants [57]. Les naevi ou moles sont des lésions pré-néoplasiques qui régressent le plus souvent [23,96,97]. Cependant, lorsqu'elles évoluent de façon maligne, trois phases sont fréquemment observées ; une transformation en naevi dysplasique puis, une progression dans un premier temps de façon verticale qui précède une progression horizontale amorçant la dissémination ou métastase des cellules malignes dans l'organisme [23,56,83,85,96-98] (**Figure 9B**).

Classiquement, quatre sous-types de mélanomes existent dont : le mélanome superficiel extensif, le mélanome de Dubreuilh, le mélanome acral et le mélanome nodulaire [56,57,83,85,93,99]. Le mélanome superficiel extensif et le mélanome de Dubreuilh sont des sous-types de mélanomes cutanés dont la genèse est particulièrement associée à l'exposition UV.

Le mélanome superficiel extensif, qui correspond à 70 à 80% des tumeurs [56,57], est le sous-type de mélanome le plus fréquent. La genèse de celui-ci est particulièrement associée à une fréquence importante de coups de soleil dans la petite enfance chez les personnes de phototype caucasien les plus claires (I et II) [22,23,55,59,94,96]. Il se présente sous forme d'une tache brune ou noire irrégulière dont la croissance horizontale est lente avant d'amorcer en 1 à 5 ans une croissance verticale rapide [56] (**Figure 9A et B**).

Le mélanome de Dubreuilh ou lentigo malin, qui représente 5 à 10% des mélanomes, est associé aux régions photo-exposées de façon intermittente mais également de façon chronique chez les personnes de plus de 40 à 50 ans. Il apparaît sous forme de tâches brunes dont l'aspect est lentigineux. Il évolue moins rapidement que le mélanome superficiel extensif mais reste comme tous les mélanomes inquiétants [^{56,88}].

3.3. Gènes présentant des marques de l'exposition UV et leurs contributions à la carcinogenèse cutanée

Il est important de retenir avant de commencer cette partie que comparé aux carcinomes, le poids des gènes présentant des marques de l'exposition UV dans les étapes de la progression du mélanome, particulièrement chez l'Homme, n'est pas complètement connu.

Cette disparité a été attribuée à l'hétérogénéité génétique qui peut apparaître en fonction du stade carcinogénique des différents mélanomes et leurs localisations sur des régions cutanées exposées avec plus ou moins d'intensité aux UV. D'autre part, les études de séquençage ont montré la difficulté à dissocier les mutations "passagères", des mutations "conductrices", qui s'accumulent souvent toutes deux dans le mélanome [^{48,84}].

Ajouté à cela, l'identification de mutations de *BRAF* (V600E, V599E) dans 50 à 60% des mélanomes cutanés, ont longtemps remis en cause les UV dans la genèse du mélanome [^{81,100,101}]. *BRAF* code une serine-thréonine kinase impliquée dans la voie des MAPK, Ras-Raf-MEK-ERK et dont les mutations conduisent à une activation constitutive de la protéine et une prolifération incontrôlée [⁸¹]. Paradoxalement, il a été décrit que ces mutations pouvaient être aussi bien retrouvée sur les régions exposées [¹⁰²] ou non aux UV [¹⁰³] et surtout quelles n'arboraient presque jamais des signatures UV de type C→T ou CC→TT [^{48,81,84,103}]. Néanmoins, si le gène *BRAF* semble important dans l'initiation du mélanome, de nombreuses données suggèrent que les mutations de ce gène sont nécessaires mais non suffisantes au développement du mélanome. Ainsi, l'accumulation d'autres mutations s'avèrent importantes pour la progression du mélanome [^{100,104,105}]. Dans ce sens, l'impact des mutations UV induites dans la genèse du mélanome n'a été que très récemment confirmé. Une étude de Hodish et collaborateurs (2012), confirmée depuis par Mar (2013), a mis en évidence qu'en excluant les mutations *BRAF* 60% des gènes conducteurs présentent des signatures de type C→T indicatrices de l'effet direct des UV dans le mélanome [^{48,84,98}].

De façon plus générale, les gènes présentant des mutations ponctuelles avec des marques de l'exposition UV dans les différents cancers cutanés sont nombreux. Ces marques peuvent correspondre à l'effet direct des UV sur l'ADN ou résulter de réactions d'oxydation indirectement générées par l'exposition UV [^{45-48,53}] (**Figure 7 A et B**). Par ces effets, on peut identifier de façon récurrente l'altération du gène *TP53* dans les trois types de cancers. Plus limitées aux SCC et aux mélanomes, les mutations des gènes *CDKN2A* et *RAS* constituent des événements fréquents. De façon spécifique au BCC, les altérations génétiques des composants de la voie

PTCH/SHH sont très souvent observées. Enfin, dans le mélanome, les mutations du gène *PTEN* constituent également des événements récurrents. Dans un souci de synthèse nous nous focaliserons sur la nature des mutations de ces gènes, les fréquences dans lesquelles elles sont observées dans les différents cancers et, leurs rôles prouvés ou potentiels dans le processus de carcinogenèse (**Figure 9B et Tableau I**).

3.3.1. Altération du gène *TP53*

TP53 code pour la protéine p53, un facteur de transcription exprimé de façon ubiquitaire et important pour la réponse cellulaire à de nombreux stress incluant, les agents biologiques, chimiques ou physiques comme les UV [^{106,107}]. La protéine p53, nommée gardienne du génome, régule l'expression de plus d'une centaine de gènes important pour le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et même la pigmentation des cellules cutanées [¹⁰⁷⁻¹⁰⁹]. Les mutations du gène *TP53* sont extrêmement fréquentes dans les BCC et SCC alors que dans le mélanome elles constituent des événements plus rares (**Tableau 1**). Ainsi, dans les carcinomes qui représentent 95 à 97% des cancers cutanés [⁵⁶⁻⁵⁸], les mutations du gène *TP53* sont retrouvées dans 30-60% et presque que 90% des BCC et SCC respectivement [^{63,72,89,90,110-114}]. Dans le mélanome, les mutations du gène *TP53* sont retrouvées dans moins de 10% des tumeurs [⁹⁸].

Au niveau du spectre des mutations ponctuelles du gène *TP53* (**Tableau 1**), les séquençages du gène montrent des transitions C→T, CC→TT dans les sites riches en pyrimidines dans 30-70% et presque 100% des mutations de *TP53* observées dans les BCC et SCC respectivement [^{63,72,90,110-116}]. Il est important de souligner que les chiffres recensant les mutations de *TP53* dans les cancers cutanés et particulièrement dans les carcinomes sont énormément augmentés chez les patients XP (Chap.2, sect.2.3) [^{50,52}]. Dans les tumeurs issues de ces patients, il a été reporté que les mutations de *TP53* présentant des signatures C→T et CC→TT caractéristiques pouvaient être entre 2 et 3 fois plus importante que chez les sujets non XP [^{51,78}]. Dans le mélanome, les mutations ponctuelles de *TP53* comprennent dans 40 à 65 % des cas des transitions C→T, CC→TT mais également des transitions G→A et T→A vraisemblablement indicatrices de l'effet du stress oxydant généré par les UV [^{48,78,84,104}]. Que ce soit dans les carcinomes ou dans les mélanomes, les mutations de *TP53*, fréquentes dans le domaine de liaison à l'ADN, sont responsables d'une perte de la fonction transcriptionnelle de la protéine p53 [^{51,113}].

La contribution des mutations du gène *TP53* dans le processus carcinogénique des différents cancers varie en fonctions de leur type. Dans les BCC et les SCC, il a été décrit que les mutations du gène *TP53* constituent des événements qui apparaissent probablement très tôt et qui sont potentiellement associés à l'initiation de la carcinogenèse [^{51,52,63,78,89,90,112-115}]. De façon importante, il est estimé que dans les régions photo-exposées, 4% des cellules de l'épiderme contiennent des mutations du gène *TP53* avec des signatures UV caractéristiques. Néanmoins, ces dernières ne conduisent pas immédiatement à la carcinogenèse dont le développement serait dépendant de mutations supplémentaires. Ainsi, les "foci" de cellules mutées pour

	% des Cancers	TP53	CDKN2A	RAS	PTEN	PTCH	SHH	SMO
BCC	80-90%							
% des BCC		30-60%	24%			30-50%	2%	10-20,6%
Mut. UV		C > T, CC > TT	(p16INK4) C > T, CC > TT, G>A, GG>AA, C>G, T>A			C > T, CC > TT	C>T, CC>T, G>A	C>T, CC>TT, G>T
% des Mut.		30-70%	66%			30-40%	sp. XP	30%, 21% (G>T)
Réf.		[110,111,117]	[110,117-120]			[52,74,78,87,89,90,121,122]	[80]	[79]
SCC	15-20%							
% des SCC		80-90%		<10%				
Mutations UV		C > T, CC > TT		(Ha-RAS) CC > TT				
% des Mut.		100%		81%				
Réf.		[63,72,90,112-114,116]		[123]				
MM	1-3%							
% des MM		10%	30-70%	20%	5-20%			
Mut. UV		C > T, CC > TT, G>A, T>A	C>T, G>T	C>T, G>T, A>T, G>A	C>T, G>T, G>A, T>A			
% des Mut.		40%-65%	(p16INK4), 45-55%, p14ARF, 55%<x65%	10%-45%	30%-70%			
Réf.		[48,78,84,104]	[48,124-126]	[48,62,75,77,127,128]	[48,61,84]			

Tableau 1 : Part des mutations associées à l'exposition UV dans les différents cancers.

(sp. XP=mutations détectées spécifiquement chez les patients XP, Tableau élaboré à partir des références cités dans le tableau et le corpus. Carcinome basocellulaire BCC, Carcinome épidermoïde SCC, Mélanome MM, Mut.=Mutations).

TP53, qui se développent de façon dose dépendante de l'exposition UV, constituent de bons marqueurs pré-néoplasiques dans les carcinomes et particulièrement dans le SCC [72,116]. Dans ce sens mais dans les BCC cette fois, il a été montré que les mutations de *TP53* conduisent à une instabilité génomique qui favorise les mutations sur d'autres gènes suppresseurs de tumeur comme le gène *PTH* [78,87,89,122].

Dans le mélanome, l'altération du contrôle du cycle cellulaire, particulièrement l'arrêt G1/S est un élément déterminant dans le développement du mélanome. Dans ce processus, la dérégulation de la fonction de la protéine p53 et l'induction de sa cible transcriptionnelle, *p21^{WAF1/CIP1}* (*CDNK1A*), a un rôle cruciale dans le développement du mélanome [124,129]. Le moment exact où les mutations du gène *TP53* apparaissent durant le développement du mélanome est cependant discuté. Ainsi, certaines études assument que les mutations de *TP53* constituent des événements précoces [124,130], alors que d'autres les suggèrent comme tardifs [48,64,84,131]. Si les mutations de *TP53* sont rares dans le mélanome, il est important d'indiquer que la perte de fonction de la protéine pourrait être sous-estimée dans ce cancer. En effet, indépendamment des mutations du gène *TP53* au sens strict, d'autres régulateurs cruciaux de la stabilité de la protéine p53 peuvent présenter des mutations typiques de l'exposition UV dans le mélanome. Ainsi, l'absence ou la perte de fonction de la protéine p14^{ARF}, due à des mutations du gène *CDKN2A*, entraîne une diminution de la stabilité de la protéine p53. Par ce biais, les altérations des protéines p14^{ARF} et/ou p53 augmenteraient la vitesse de progression du mélanome primaire vers le stade métastatique [48,84,124,131,132]. D'autres mécanismes plus indirects et mal connus, impliquent la surexpression de MDM2, indépendamment de sa mutation, qui corrèle également avec la progression métastatique du mélanome [133]. L'augmentation de l'agressivité du mélanome promue par la surexpression de MDM2 pourrait impliquer une dégradation massive de la protéine p53 impliquée dans le contrôle du cycle et l'apoptose. Dans ce mécanisme, la perte d'expression ou de fonction de p14^{ARF} dues à des mutations du gène *CDKN2A* joueraient un rôle majeur dans le niveau élevé de MDM2 et la dégradation de p53 [48,84,124,125,131,134].

3.3.2. Altération du gène *CDKN2A*

Le gène *CDKN2A* est soumis à épissage alternatif permettant de générer deux transcrits importants, respectivement, *p16^{INK4}* et *p14^{ARF}* (ou *19^{ARF}* chez la souris) [76,135]. La protéine p16^{INK4}, comme la protéine p21^{WAF1/CIP1}, fait partie de la famille des inhibiteurs de kinase associés aux complexes cycline-CDK (CKI). p16^{INK4} est particulièrement importante pour la régulation négative des complexes cyclines D-CDK4/CDK6 dont l'activité est nécessaire à l'hyperphosphorylation de la protéine Rb et la progression G1/S (Chap.2, sect.2.2) [136]. L'autre protéine codée par le gène *CDKN2A* est p14^{ARF} qui est particulièrement impliquée dans le stress nucléolaire [76,137]. En présence de stress, dont le stress UV, p14^{ARF} est notamment capable, par interaction protéine-protéine, de neutraliser la protéine MDM2. MDM2 est une ubiquitine ligase de type E3 majoritairement impliquée dans la régulation négative de la disponibilité de la protéine p53 (Chap.3, sect.1.3.4.). Ainsi, p14^{ARF}, par le biais de la neutralisation de MDM2, favorise la stabilité du suppresseur de tumeur p53 [135,138]. Les mutations du gène *CDKN2A* intéressent particulièrement les SCC et le mélanome. En effet, il a été estimé que 24% et 30 à 70% des SCC et des MM

respectivement présentaient des mutations du gène *CDKN2A* [83,98,110,117,118,120,139–141]. De façon commune, les mutations du gène *CDKN2A* affectant le transcrit *p16^{INK4}*, présentent des transitions typiques de l'effet direct des UV (C→T, CC→TT) mais également des marques du stress oxydant généré par l'exposition UV (G→A et G→T). Ces transitions sont retrouvées dans 66% et 45 à 55% des mutations ponctuelles détectées dans les SCC et les MM respectivement [48,84,110,117–120,124,126,134,139]. De façon plus restreinte au MM, ces transitions constituent 55 à 65% des mutations ponctuelles du gène *CDKN2A* qui affectent le transcrit *p14^{ARF}* [48,84,124–126,139].

Concernant les mutations qui affectent le transcrit *p16^{INK4}*, que ce soit dans le SCC ou le MM, celles-ci engendrent le plus souvent une protéine p16 tronquée, non fonctionnelle. Cette perte de fonction se traduit par une abolition des effets antiprolifératifs normalement promus par la protéine p16^{INK4} [48,110,117,118,120,124,126]. De façon intéressante, il a été proposé que la protéine p16^{INK4} peut être impliquée dans le maintien du caractère sénescence des lésions pré-néoplasiques et que sa perte d'expression peut conduire à la transition du stade KA en SCC [118,119]. D'autres parts, il est à noter que les mutations de *TP53* et de *p16^{INK4}* peuvent être significativement associées dans les SCC. L'étude des carcinomes, chez les patients XP particulièrement, a ainsi montré que si les mutations de *TP53* constituent des éléments initiateurs, les mutations inactivatrices de *p16^{INK4}* peuvent constituer un deuxième "hit" mutationnel favorisant la progression et l'agressivité des tumeurs [117,142]. Dans le cadre du mélanome, l'extinction de la protéine p16^{INK4} a également été associée à l'augmentation de l'agressivité du mélanome [124,134]. Dans le cas des mutations inactivatrices affectant le transcrit *p14^{ARF}*, la stabilité et la fonction du suppresseur de tumeur p53 sont altérées [48,124,125]. Dans le modèle animal, il a été montré que l'implication des mutations du gène *CDKN2A* dans la genèse et l'agressivité du mélanome pouvait être dépendante de la dérégulation d'autres gènes. Ainsi, dans le modèle murin déficient en protéine p16^{INK4} ou p19^{ARF} (p14^{ARF} chez l'Homme) l'activation de l'oncogène RAS et/ou la perte de fonction de la protéine p53 sont importantes dans la formation de mélanomes très agressifs [48,65,66,84,124,125,131].

3.3.3. Altération du gène RAS

Les gènes *RAS* codent pour les petites protéines G : Ha-Ras, Ki-Ras et N-ras. Ces protéines sont recrutées et activées par de nombreux récepteurs membranaires dont des récepteurs à activité tyrosine kinase ou des récepteurs à 7 passages membranaires et couplés aux petites protéines G [62,85,127,143]. Ces derniers sont capables d'activer la protéine Ras et d'initier la cascade mitogénique Raf-MEK-ERK [143]. Parmi les gènes *Ras*, *Ha-Ras* et *N-Ras* présentent souvent des mutations associées à l'exposition UV dans les SCC et le MM.

Dans les SCC, les mutations de *Ha-RAS* et *N-Ras* sont retrouvées dans moins de 10% des cas [62,75,144] alors que dans le MM, les mutations de *N-RAS* sont retrouvées dans 20% des cas [48,84]. Dans les SCC il a été montré que 81% des mutations ponctuelles du gène *HA-Ras* particulièrement sont des transitions CC→TT [123]. Dans le mélanome, il a été observé que le spectre mutationnel du gène *N-Ras*

pouvait comprendre 10% à 45% de marques de l'exposition UV : dont des transitions C→T indicatrices d'un effet direct des UV et, des marques de leur effet oxydant avec des transitions de type G→A [48,62,75,84,128].

Que ce soit dans le SCC ou dans le mélanome, les mutations des gènes *RAS* aboutissent à l'activation constitutive de ces petites protéines G et à une prolifération incontrôlée [62,75,123,128,143,145]. Dans le MM particulièrement, il a été décrit que les mutations de *RAS* peuvent constituer un premier "hit" dans l'initiation du mélanome mais la synergie avec d'autres types de mutations sont importantes à la progression tumorale [75,77,127,128]. Ainsi, dans le modèle murin, les pertes de fonction des protéines p16^{INK4} et p53 sont nécessaires à la progression tumorale quand les protéines Ras sont constitutivement activées [129,131,146].

3.3.4. Altération du gène *PTEN*

Le gène *PTEN* code pour une phosphatase régulant négativement la voie de survie et anti-apoptotique PI3K-AKT [147]. Les mutations de *PTEN* ont été impliquées dans 5 à 20% des mélanomes sporadiques [83,98,148]. Les mutations portées par *PTEN* présentent très fréquemment des marques de l'exposition UV. Aussi il a été montré que 73% des substitutions de nucléotides sur ce gène concernaient des transitions C→T dans les mélanomes primaires [48,84]. En plus des transitions C→T, d'autres types de transitions particulièrement G→A et T→A communes à l'exposition UV (**Figure 7A et B**), peuvent représenter jusqu'à 91% des mutations observées sur le gène *PTEN* dans les mélanomes issus de patient XP [61]. Les mutations de *PTEN* entraînent le plus souvent l'inactivation de la protéine engendrant une activation constitutive de sa cible AKT. L'activation constitutive d'AKT maintient la survie des cellules tumorales et les rend résistantes à l'apoptose [61,149]. Enfin, il a été suggéré que l'inactivation de *PTEN* représenterait un "hit" probablement secondaire favorisant l'agressivité du mélanome et sa métastase (**Figure 9 B**). Ainsi, lorsque *BRAF* est muté, il a été observé que *PTEN* était également muté ou délété dans 10% des cas [100,150].

3.3.5. Altération des gènes de la voie PTH/SHH

PTCH code pour une protéine à douze passages transmembranaires capable de fixer le ligand sonic hedgehog (SHH). La régulation de cette voie est impliquée dans le développement embryonnaire et la régulation de la différenciation des kératinocytes de l'épiderme [87,151]. En absence de son ligand SHH, l'activation de PTCH régule négativement et de façon constitutive un autre récepteur à sept passages transmembranaires nommé smoothened (SMO). La répression de SMO bloque l'activation par ce dernier des facteurs de transcription de la famille GLI et de leurs cibles transcriptionnelles comme les gènes codant pour les facteurs de croissance TGFβ, BMP ou WNT et du récepteur PTCH [52,74]. L'activation de GLI2 particulièrement entraîne au niveau des kératinocytes, une répression de leur différenciation et promeut leur prolifération [151]. Par cette voie, des mutations

inactivatrices de *PTCH*, qui causent une levée d'inhibition du récepteur SMO, sont impliquées dans l'induction de la transformation des kératinocytes [^{87,151}].

Le gène *PTCH* présente très fréquemment des mutations typiques de l'exposition UV [^{52,74}]. Il a ainsi été démontré que 30% à 50% des BCC sporadiques présentent des mutations inactivatrices du gène *PTCH* et 30 à 41% de ces mutations sont des signatures C→T et CC→TT liées l'exposition UV [^{52,74,89,90}]. Ces chiffres s'accroissent dans les tumeurs des patients atteints de XP chez lesquels il a été reporté que les mutations de *PTCH* peuvent être retrouvées dans 50 à 90% des cas de BCC. Chez ces patients, les mutations typiques de l'exposition UV peuvent représenter jusqu'à 80% des mutations ponctuelles du gène *PTCH* [^{73,78}]. Fonctionnellement, l'inactivation de *PTCH*, comme celle de p53, est considérée comme une étape précoce dans l'initiation du BCC [^{78,87}].

D'autres composants de la voie sonic hedgehog, de façon moins fréquente, peuvent également présenter des mutations typiques de l'exposition UV qui aboutissent à l'activation constitutive de cette voie. Ainsi, des mutations des gènes codant le ligand SHH (environ 2% des BCC) ou le récepteur SMO (entre 10-20,6% des BCC) sont également impliqués dans la genèse et le développement des BCC [^{79,80}].

En conclusion de cette partie, il est à retenir que les UV sont des carcinogènes complets largement impliqués dans la genèse de la majorité des cancers cutanés. De manière directe ou indirecte, l'exposition aux UV solaires induit des lésions à l'ADN qui provoquent une instabilité génomique impliquée dans la transformation des kératinocytes et des mélanocytes. Ainsi, de nombreuses marques des effets mutagéniques des UV sont retrouvées sur plusieurs oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs dont les fonctions sont dérégulées.

En contraste avec l'exposition chronique aux UV obligatoirement associée à la vie sur terre, la carcinogenèse cutanée est toutefois limitée par des mécanismes de protection dont la vaste majorité des Hommes est dotée. Ainsi, le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la pigmentation facultative contribuent de façon importante à atténuer le risque d'instabilité génomique promu par l'exposition UV. Dans les parties suivantes, nous étayerons ces mécanismes de protection avec une attention particulière sur le rôle crucial joué par le suppresseur de tumeur p53 dont la perte de fonction, directe (mutations de *TP53*) ou indirecte (mutations des régulateurs de p53), est très fréquemment observée dans les cancers cutanés.

Chapitre 2 Les systèmes de défenses cellulaires contre l'instabilité génomique promue par l'exposition UV

La réaction de la peau face à l'exposition UV implique des mécanismes cellulaires qui permettent de réparer les dommages générés immédiatement mais également des mécanismes de prévention assurant une protection transitoire contre une future exposition. En absence d'anomalies génétiques (déficience dans les systèmes de réparation ou albinisme par exemples), la mise en place et la durée de ces phases dépendent de la fréquence d'exposition et du phototype de l'individu [152,153].

1. Notions de réponse précoce et réponse tardive à l'exposition UV

De façon immédiate, la peau exposée aux radiations UV subit un control négatif de la prolifération de ses composantes cellulaires. Chez l'homme [154], le porc [155] et la souris [156], la prolifération des cellules de l'épiderme et particulièrement les kératinocytes de la couche basale est arrêtée de façon transitoire dans les 12 à 24h suivant l'irradiation. Cet arrêt est concomitant au processus de réparation de l'ADN qui permet de réduire significativement la quantité de dommage dans cette fenêtre de temps [156,157]. Cette réponse à l'exposition UV est qualifiée de réponse précoce. Par opposition, l'apparition de cellules apoptotiques appelées "sunburn cells" dans les 24 h post irradiation [153,158] marque le début de la phase inflammatoire et la transition vers la phase de maintenance. Cette phase est associée à une hyperplasie et une pigmentation de l'épiderme qui apparaissent entre les 24-72 h post irradiation [157,159,160]. Cette deuxième étape de la réponse aux UV est généralement qualifiée de phase tardive.

2. Réponse précoce à l'exposition UV

2.1. Reconnaissance des dommages et transduction du signal de stress

Les UV induisent des dommages à l'ADN mais sont également impliqués dans la formation de ROS. Ces signaux vont être reconnus par des kinases de stress qui vont permettre de « transduire » l'information à des facteurs de transcription afin d'adapter la réponse cellulaire à l'environnement. Parmi ces voies, on distingue les voies initiées par les kinases de la famille PIKK (phosphatidyl inositol 3' kinase-related kinases); ATM/ATR et DNAPK, et les MAPK, particulièrement p38 et JNK qui assurent la transduction des dommages induits par l'exposition UV.

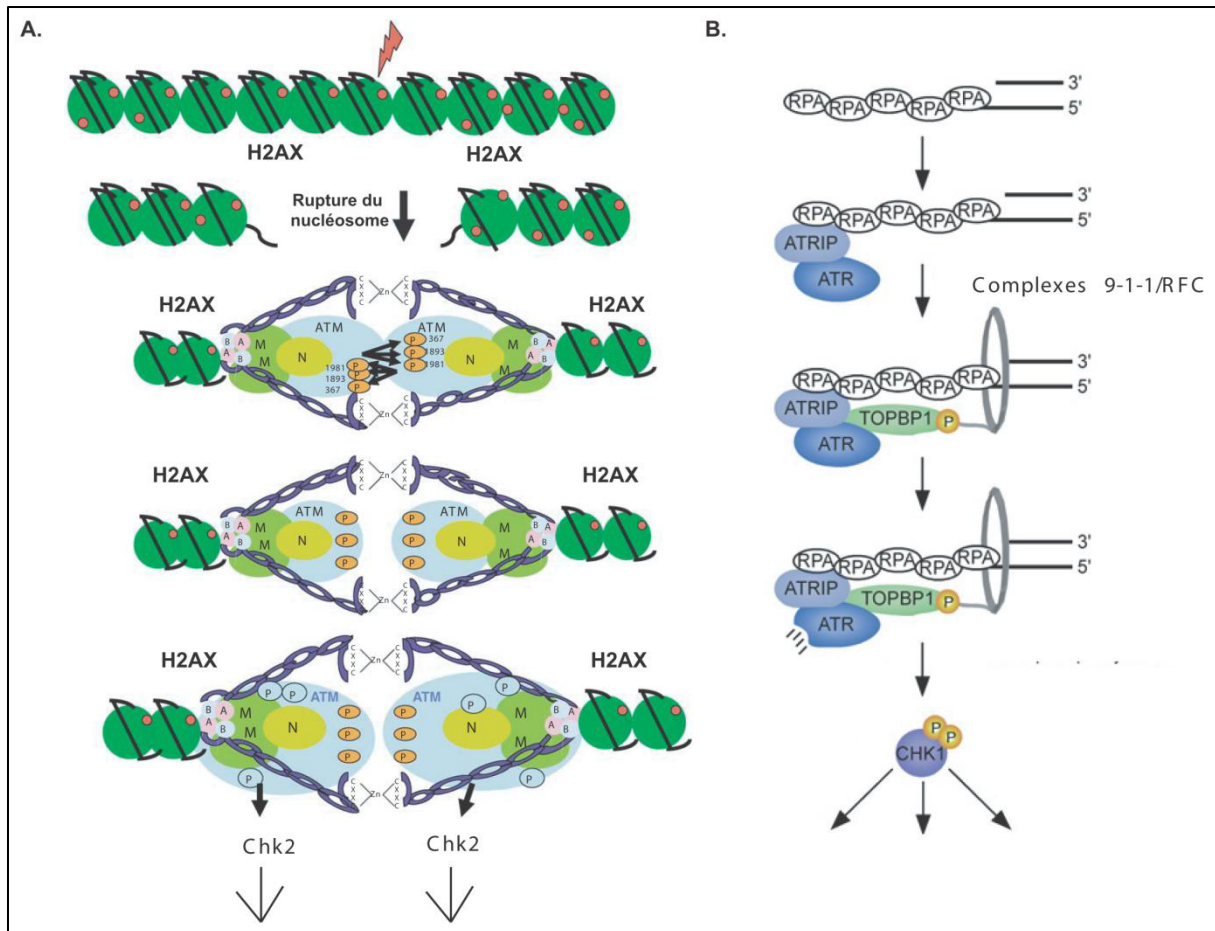


Figure 10 : Recrutement d'ATM et d'ATR aux sites lésionnels sur d'ADN.

A. Modèle proposé pour la fixation d'ATM sur les cassures doubles brins. ATM se fixe à l'ADN par l'intermédiaire du complexe MRN (Mre11=M, Nbs1=N, Rad50=A et B) ce qui lui permet d'être activée et de recruter la kinase CHK2. B. Modèle proposé pour la fixation d'ATR sur les sites monobrin de l'ADN. ATRIP se lie à l'ADN par l'intermédiaire des protéines RPA et du complexe 9-1-1/RFC qui lui permettent de recruter ATR. ATR activé peut ensuite phosphoryler CHK1. (Illustrations adaptées à partir des réf. [161,162]).

2.1.1. Les voies ATM/ATR

Les voies ATM/ATR constituent de véritables senseurs de la présence des dommages à l'ADN. Ces protéines vont reconnaître les lésions à l'ADN et initier les cascades activatrices menant en particulier aux différents points de contrôle du cycle cellulaire. L'activité de ces senseurs est très souvent dépendante de médiateurs qui assurent leurs liaisons à l'ADN et qui leurs permettent de recruter les effecteurs de la réponse. Les protéines ATM/ATR correspondent à des Serine/Thréonine kinases qui sont impliquées dans l'initiation de la réponse cellulaire au stress génotoxique dont les UV [163,164]. Bien qu'il ait été montré que ces kinases puissent être fixées et activées après liaison directe à l'ADN [165,166], *in vivo* leur fixation aux sites lésionnels requiert l'intervention de protéines accessoires. Ces protéines accessoires peuvent être : des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, des protéines de remodelage de la chromatine ou même des facteurs de transcription [161,162].

Les protéines ATM et ATR sont des protéines nucléaires de haut poids moléculaires (350 et 301 kDa respectivement) avec une certaine spécificité réactionnelle au regard du type de dommages à l'ADN. Classiquement, il est décrit que la protéine ATM est principalement activée par les cassures double brins générées de façon majeure par les radiations ionisantes et peu par les UV [167,168]. A l'inverse, ATR est plus largement activée par les cassures simples brins et le blocage des fourches de réplication engendrés par les radiations UV [169]. Cette distinction n'est pas aussi simple et plusieurs études montrent un chevauchement et une complémentarité entre les voies ATM et ATR pour la reconnaissance des lésions à l'ADN et l'initiation de la réponse cellulaire. Particulièrement, le blocage des fourches de réplication (stress réplcatif) et leur dissociation, causés par des adduits générés par les UV, peuvent mener à la formation de cassures doubles brins. Dans ce cas il a été montré que la voie ATM pouvait être mobilisée par l'intermédiaire de la voie ATR [170]. Aussi, les rayonnements UV par le biais des dommages à l'ADN générés activent majoritairement la voie ATR mais sont susceptibles, par notamment les intermédiaires de réparation, d'aboutir à l'activation d'ATM.

Les protéines ATM et ATR sont activées après leur fixation à l'ADN. ATM présent sous sa forme dimérique (inactive) se fixe sur les extrémités lésées de l'ADN [165,171]. Cette fixation dissocie le dimère en monomères et expose son domaine kinase. La fixation d'ATM à l'ADN est médiée par le complexe MRE11/RAD50/NBS1 qui l'oriente sur le site des lésions et participe à son activation [161,165,172] (**Figure 10A**). ATR se fixe sur l'ADN par l'intermédiaire de son partenaire ATRIP qui est important pour son activation [166]. Ainsi, l'ADN lésé sous forme monobrin présentant la protéine RPA permet le recrutement d'ATRIP et consécutivement d'ATR qui devient active. D'autres protéines jouant le rôle de plateforme comme les complexes multiprotéiques 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1) et RFC (Rad17-RFC2-5), qui forment une structure en forme de clampes autour de l'ADN, auraient un rôle prépondérant dans l'arrimage et l'activation d'ATR aux sites lésionnels [162,163] (**Figure 10B**).

La transduction du signal à partir des kinases ATM et ATR dépend de leur association à des médiateurs. Ces médiateurs sont des protéines contenant des domaines BRCT (Carboxyl-Terminal domain of the Breast Cancer Gene 1). Ce domaine est un motif de fixation pour les phospho-protéines qui permet les

interactions protéine-protéine et leur oligomérisation [173]. Il est notamment important pour permettre la fixation entre les protéines ATM et ATR et leurs transducteurs respectifs que sont les protéines kinases CHK2 et CHK1. Les protéines présentant ce domaine sont, 53BP1, TOPBP1, MDC1 et BRCA1 qui forment des foci aux sites lésionnels [174]. D'autres protéines peuvent assurer cette fonction comme ; la Claspin, H2AX et SMC1 qui assurent également la liaison des kinases ATR et ATM à leurs substrats [164]. Ces médiateurs ne sont pas inertes et participent fortement aux effets cellulaires médiés par les kinases ATM et ATR.

Au niveau génétique, des mutations dans les gènes codant pour les protéines ATM et ATR sont à l'origine des syndromes d'Ataxia Telegenctasia (A-T) et de Seckel. Le syndrome A-T engendre des déficiences immunitaires, une dégénérescence du système nerveux et un risque élevé de développement de cancers. Le syndrome de Seckel se caractérise par un défaut de croissance et des affections mentales [175,176]. Au niveau de la réponse aux dommages à l'ADN, il a été montré que les cellules originaires de patients atteints d'A-T ou du syndrome de Seckel peuvent présenter une altération de la réponse aux UV. Ainsi, les cellules A-T et ATR-Seckel présentent des défauts de réparation des lésions à l'ADN de type CPD et 6-4P ainsi que des défauts de contrôle du cycle en réponse aux UV [177,178].

2.1.2. La voie DNAPK

Le dernier membre de la famille PIKK pouvant jouer le rôle de senseur des dommages à l'ADN est la protéine DNAPK. La protéine DNAPK est un trimère formé d'une sous-unité catalytique, DNAPKcs, et de deux sous-unités régulatrices, Ku70 et Ku80. L'association des sous-unités Ku70 et Ku80 à l'ADN permet le recrutement et l'activation de la sous unité catalytique DNAPKcs [163,164]. La protéine DNAPK a un rôle prépondérant dans la réparation des dommages à l'ADN de type NHEJ (Non-homologous end joining) mais, elle est au même titre qu'ATM capable de transduire l'information générée par les cassures double brins. Comme pour ATM, DNAPK peut être activée par les UV *via* la voie ATR par l'intermédiaire du stress réplicatif potentiellement générateur de cassures double brins [170,179].

2.1.3. La voie des MAPKs, JNK et p38

Les MAPKs correspondent à une famille de Serine/Thréonine kinases qui peuvent être activées par une grande variété de stimuli, qui inclut l'exposition UV. Les voies de transduction des MAPK comprennent les modules, ERK, p38 et JNK tous activables par phosphorylation de leurs résidus Thréonine et Tyrosine présents dans leurs boucles d'activation [180]. Chacun de ces membres peut être activé en réponse à divers stimuli et possède ses propres cibles. La voie ERK est généralement activée par des signaux mitogéniques alors que les voies JNK et p38 sont activées en réponse aux stress cellulaires. Ces voies sont capables d'initier plusieurs types de signaux dont des signaux pro-différenciants, mitogéniques ou pro-apototiques [181]. L'induction de ces différentes voies en réponse aux UV pourrait dépendre du type d'UV. Dans ce schéma, les UVA entraîneraient une forte activation d'ERK alors que

JNK ne serait activable que par les UVC. En revanche, la voie p38 serait activable quelle que soit la nature des UV [182].

Les protéines de la famille p38 sont représentées par cinq isoformes protéiques : p38 α , β 1, β 2, γ , et δ [180,183]. En réponse aux UV, ces kinases sont particulièrement importantes pour la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose ou même la pigmentation [184-187]. Sous l'effet des UV, la cascade permettant l'activation de p38 impliquerait en amont l'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase et des cascades de phosphorylation impliquant les modules MKK3-MKK4-MKK6 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3,4 et 6) [180,181,184]. Le mécanisme de "sensing" des dommages causés par les UV à l'origine de l'activation de cette voie reste encore discuté. Cependant, l'activation spontanée des récepteurs membranaires, et particulièrement de l'EGFR, en réponse aux ROS générées, constituerait un signal initiateur de la cascade. Dans ce cas l'activation spontanée du récepteur par les UV pourrait faire intervenir par le biais des ROS générés ; un clustering des récepteurs à la surface et leur autophosphorylation [188,189] ou l'inhibition des phosphatases responsables de la régulation négative de l'activité de l'EGFR [190].

2.2. Blocage du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN

L'arrêt transitoire du cycle cellulaire dans la peau s'applique majoritairement aux kératinocytes des couches basale et suprabasale qui sont des cellules proliférantes [8,155,156]. Cependant, les cellules dites résidentes, telles que les mélanocytes [154] bien que moins dynamiques en terme de prolifération peuvent également être affectées. Cette modulation de la prolifération cellulaire est médiée par des points de contrôle spécifiquement activés en réponse aux agents endommageant l'ADN. Ces points de contrôle permettent d'arrêter les transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire (**Figure 11 et 12**). L'activation de ces mécanismes va permettre de bloquer ou de retarder le cycle cellulaire afin de permettre la réparation de l'ADN. Dans un souci de clarté l'accent sera placé sur les voies canoniques qui font intervenir les kinases ATM et ATR qui seront décrites dans un premier temps. La deuxième partie regroupera les données sur les voies non canoniques qui font intervenir les kinases DNAPK et p38.

2.2.1. Voies canoniques faisant intervenir les kinases ATM et ATR

2.2.1.1. L'arrêt G1/S et intra-S en réponse aux dommages à l'ADN

- L'arrêt G1/S

La transition G1/S et la progression dans la phase S sont intimement liées à la régulation des complexes cycline D/Cdk4, cycline E/Cdk2 et cycline A/Cdk2 [191] (**Figure 11A**). Le passage de la phase G1 à la phase S est particulièrement corrélé à la libération du facteur de transcription E2F séquestré par la protéine Rb [192]. La libération d'E2F est nécessaire à l'expression des gènes comme la cycline E [193] et la cycline A [194] qui permettent la progression dans la phase S. Cette libération d'E2F passe par l'hyperphosphorylation de la protéine Rb grâce au complexe cycline D/Cdk4 [195]. Ainsi, le blocage G1/S consiste à maintenir le facteur E2F séquestré par

la protéine Rb. Ce mécanisme, dont la mise en place est lente, est majoritairement contrôlé par la protéine p53 (**Figure 11B**). Selon la nature des dommages à l'ADN, les protéines ATM et ATR activent respectivement les kinases CHK1 et CHK2 qui sont capables de phosphoryler la protéine p53 [^{196,197}]. La phosphorylation de p53 contribue à stabiliser la protéine contre sa dégradation constitutive médiée par MDM2 [¹⁹⁸]. La protéine p53 accumulée peut ensuite induire la transcription d'inhibiteurs de complexe cycline/Cdk comme le gène *CDKN1A* (p21^{Waf1/Cip1}). La protéine p21^{Waf1/Cip1} se fixe physiquement au complexe cycline D/Cdk4 et bloque ainsi l'hyperphosphorylation de la protéine Rb [¹⁹⁹].

- Le blocage intra-S

La progression dans la phase S dépend de la formation des complexes de réplication et de la progression des fourches de réplication qui sont régulées par les complexes cycline E/Cdk2 et cycline A/Cdk2 [^{191,200}] (**Figure 11C**). Un des éléments clefs de la progression en phase S est l'initiation de la réplication qui dépend du recrutement des protéines RPA et de la polymérase α par la protéine Cdc45 aux origines de réplication. L'association de la protéine Cdc45 aux origines de réplication est elle-même dépendante du complexe de pré-initiation de la réplication composé des protéines Cdc6-MCM2-7-CDT1-MCM10 fixées sur les origines de réplication. La phosphorylation des protéines MCM2-7 par les complexes cycline E/Cdk2 et cycline A/Cdk2 permet le recrutement de la protéine Cdc45 et l'amorçage de la réplication de l'ADN [²⁰⁰⁻²⁰²].

Contrairement à l'arrêt G1/S, le blocage intra-S est un mécanisme quasi immédiat (**Figure 11C**). Il consiste majoritairement à inhiber l'activité des complexes cycline E/Cdk2 et cycline A/Cdk2 qui permettent le chargement de Cdc45 aux origines de réplication. L'activité des complexes cycline E/Cdk2 et cycline A/Cdk2 est régulée positivement par la phosphatase nucléaire Cdc25A [²⁰³]. En réponse aux agents endommageant l'ADN, l'activation des kinases CHK2 et CHK1 par l'intermédiaire d'ATM et d'ATR entraîne la phosphorylation de Cdc25A [^{204,205}]. Cette phosphorylation inhibe Cdc25A en causant son export nucléaire et sa dégradation par le protéasome [^{206,207}]. En conséquence, les complexes cycline E/Cdk2 et cycline A/Cdk2 ne peuvent plus être activés ce qui entraîne le blocage du chargement de Cdc45 et par conséquent l'initiation et la progression de la réplication de l'ADN [²⁰²].

Il est à noter que la formation des complexes de pré-initiation commence en fin de phase G1 juste après le point de restriction [^{201,203}]. Aussi, l'inhibition de Cdc45 constitue un élément rapide d'arrêt durant la phase G1 alors que l'activation de p53 correspond à un mécanisme de maintenance de l'arrêt dans cette phase.

2.2.1.2. L'arrêt G2/M en réponse aux dommages à l'ADN

La progression dans la phase M est régulée par l'activité du complexe cycline B/Cdk1(ou CDC2) [^{191,208}]. Comme pour l'arrêt G1/S, deux types de mécanismes vont être mis en place pour réguler l'activité du complexe cycline B/Cdk1. Selon la nature des dommages à l'ADN, les voies ATM et ATR sont mobilisées pour assurer à la fois un blocage qui va être indépendant de la protéine p53 (voie rapide) et un autre qui va dépendre de la protéine p53 (voie lente) (**Figure 11B**).

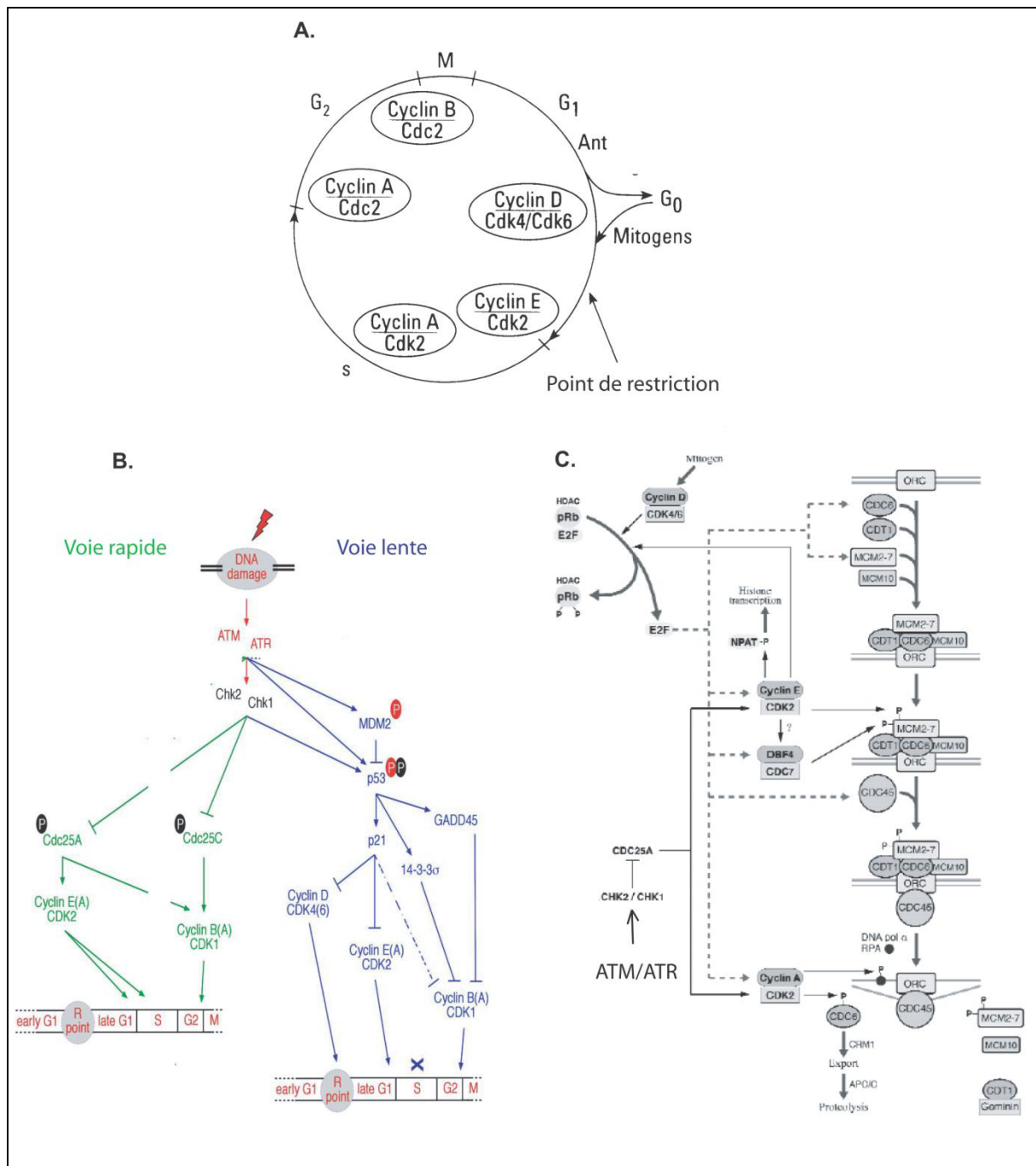


Figure 11 : Voies canoniques d'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN induits par les UV.

A. Représentation du cycle cellulaire et des complexes cycline /CDK importants pour la progression dans ce dernier. B. Arrêt G₁/S et G₂/M initiés par l'activation des voies ATM et ATR (Adapté de réf. [191]). C. Mécanisme du blocage intra-S (Adapté de réf. [200]).

De façon indépendante de la protéine p53, le mécanisme clef du blocage en phase G2 (voie rapide) consiste en la régulation négative de la phosphatase Cdc25C (et probablement Cdc25B) qui permet d'activer le complexe cycline B/Cdk1 [^{191,208}]. De la même manière que pour Cdc25A, Cdc25C est régulé de façon protéasome dépendante [²⁰⁹]. Comme précédemment, la phosphorylation de Cdc25C par les voies ATM/ATR provoque son export nucléaire et sa dégradation par le protéasome.

La voie lente fait intervenir p53 et la régulation transcriptionnelle de *CDKN1A*, *GADD45* et *14-3-3 sigma* (ou SFN) qui permettent de maintenir l'arrêt de la phase S. Les protéines GADD45 et 14-3-3 sigma vont toutes deux agir en régulant la disponibilité du complexe cycline B/Cdk1. GADD45 entraîne la dissociation du complexe cycline B/Cdk1 et le rend inactif [²¹⁰] alors que 14-3-3 sigma séquestre le complexe cycline B/Cdk1 dans le cytoplasme et empêche son import dans le noyau [²¹¹].

2.2.2. Voies non canoniques de contrôle du cycle en réponse aux dommages à l'ADN

- L'activation de la kinase DNAPK

La protéine DNAPK peut également être activée par les UV *via* la voie ATR par l'intermédiaire du stress réplicatif qui comme nous l'avons vu peut être une source de cassures double brins [^{170,179}]. Cependant, les conséquences de l'activation de DNAPK sur le cycle cellulaire en réponse aux UV ne sont pas bien connues. Néanmoins, une étude a montré que la perte d'expression de DNAPK altérerait l'arrêt en phase S induit par l'exposition UV. DNAPK agirait par l'intermédiaire de la protéine RPA pour promouvoir le blocage intra-S en réponse au UV. Cependant, les cibles effectrices en aval de RPA ne sont pas étayées [²¹²].

- L'activation de la kinase p38

Les kinases p38 ont été largement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire en réponse aux UV. La kinase p38 α (p38 dans la suite du texte), la mieux caractérisée, est impliquée dans la transition G1/S mais surtout G2/M [^{184,185}]. Comme pour les kinases ATM et ATR la régulation des deux transitions mobilise des voies faisant intervenir ou non la protéine p53 (**Figure 12**).

- Arrêt G1-S

De façon dépendante de la protéine p53, la kinase p38 est capable d'activer l'arrêt G1/S. Il a été montré que la kinase p38 activée par les UV pouvait phosphoryler p53 au niveau des résidus Ser15 [²¹³], Ser33 et Ser46 [²¹⁴]. Ces modifications post-traductionnelles de p53 contribuent à inhiber son interaction avec la protéine MDM2 et favorise la stabilisation de p53 (Chap.3, sect.1.3.4.5.2.). L'activation de la protéine p53 est également permise par la formation de complexe entre la kinase p38 et la protéine p53 qui permettent de stabiliser cette dernière en réponse aux UV [^{213,215}]. Cette activation permet l'augmentation d'expression de la CKI, p21^{Waf1/Cip1}, l'inhibition de la kinase CDK2 et la progression dans le cycle cellulaire [²⁰⁹].

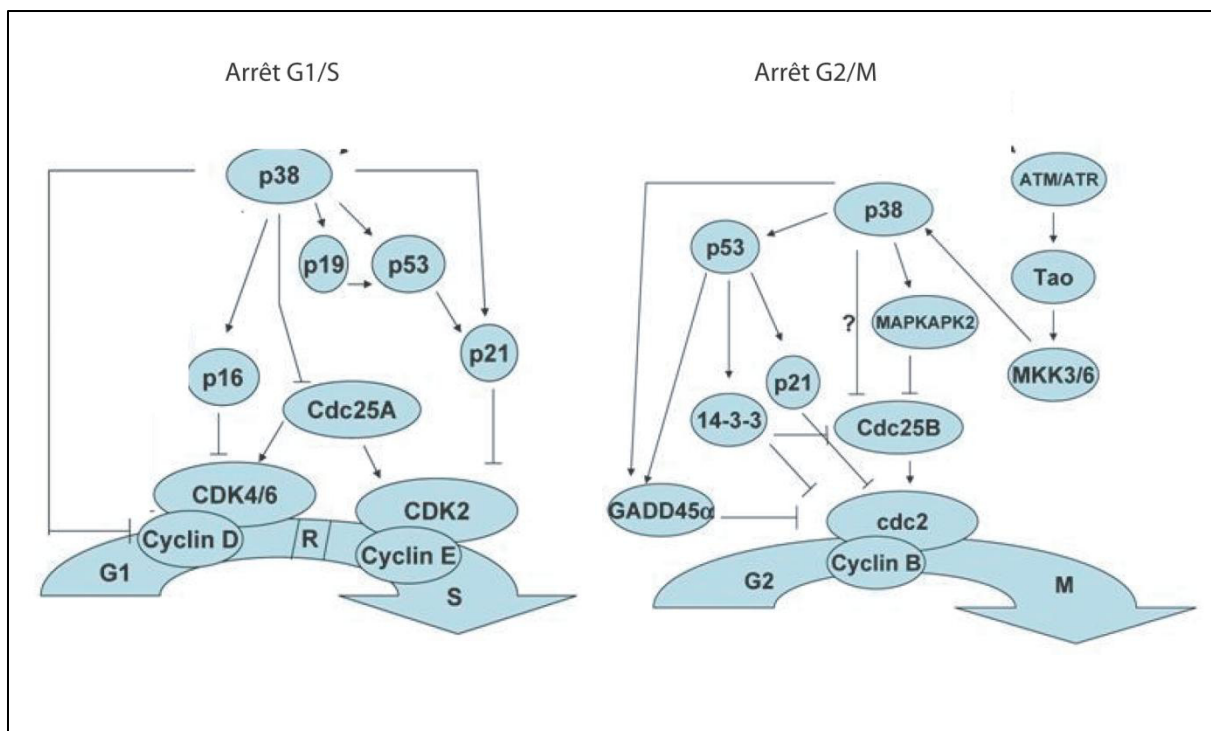


Figure 12 : Voies d'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN faisant intervenir la kinase p38.

Arrêt G1/S et Arrêt G2/M promus par l'activation de la kinase de stress p38 (Adapté de réf. [185]).

De façon indépendante de p53, la kinase p38 intervient également dans la répression de l'expression de *CCND1* (cycline D1) et l'augmentation de l'expression de l'inhibiteur de cycline *p16^{INK4}*. La régulation de ces deux gènes permet de renforcer le blocage de la transition G1/S [184]. Une autre cible de la kinase p38 est la phosphatase Cdc25A dont la phosphorylation entraîne sa dégradation et participe à l'arrêt en phase S [205,216].

- Arrêt G2/M

L'arrêt G2/M est obtenu par l'intermédiaire de l'inhibition du complexe cycline B/Cdk1. La stabilisation de la protéine p53 par la kinase p38 permet de réguler l'expression des deux cibles transcriptionnelles de p53, *14-3-3 sigma* et *GADD45*. Ces protéines permettent respectivement de séquestrer et de dissocier le complexe cycline B/Cdk1 dans le cytoplasme [210,211,215].

De façon indépendante de p53, l'activation de la voie p38 permet d'inhiber par phosphorylation les phosphatases Cdc25B et Cdc25C et l'activité du complexe cycline B/Cdk1 [216]. Ces phosphorylations permettent de créer des sites de fixation pour les protéines 14-3-3 qui séquestrent alors les protéines Cdc25 B et Cdc25 C dans le cytoplasme [209,211]. Dans le cas de la régulation de Cdc25C par la kinase p38, il a été montré que les voies ATM et ATR pouvaient participer de manière directe ou indirecte à la régulation de p38 en réponse aux dommages à l'ADN dont les UV. L'activation des voies ATM et ATR permet notamment par l'intermédiaire de la kinase Tao ou CHK1 d'induire la voie p38-MK2. En retour, la kinase MK2 induit la phosphorylation inhibitrice de Cdc25C ce qui entraîne un blocage de la progression G2/M [205,217].

En conclusion de cette partie il est à retenir que l'arrêt du cycle cellulaire est un phénomène transitoire qui peut être activé de manière rapide. De plus, la durée de cet arrêt peut être modulée en fonction du niveau de dommage et des voies cellulaires alors mobilisées. Enfin, il est à noter que l'arrêt du cycle cellulaire est particulièrement intriqué avec les mécanismes de réparation de l'ADN afin d'assurer la stabilité du génome.

2.3. La réparation de l'ADN

La réparation de l'ADN est un système conservé dans plusieurs espèces permettant la réparation d'une grande variété de lésions de l'ADN produites par des sources endogènes et exogènes. Plusieurs mécanismes de réparation spécifiques d'un ou de plusieurs type de lésions peuvent être activés en réponse aux UV [175]. Au regard de l'abondance et de la carcinogénicité des lésions de type CPD [46] nous nous focaliserons sur le mécanisme NER (Nucleotide Excision Repair). Ce mécanisme permet; la réparation des CPD mais également des 6-4PP et des pontages inter-brins qui produisent des distorsions de l'hélice ADN [218].

Le système NER requiert plus de trente gènes. Ces gènes ont été classés en 8 groupes de complémentation, XPA à XPG dont un variant XPV (associé à

Maladies	Symptômes	Gènes mutés	Sous-voies du NER déficitaires
Xeroderma Pigmentosum (XP)	Photosensibilisation, Anomalies de la peau et de la cornée Risque de cancer interne Neurodégénérescence	- XPC, XPE - XPV - XPA-XPG	- GGR - Synthèse translesionnelle - NER
Syndrome de Cockayne (CS)	Photosensibilisation Retard de croissance Maladie de la substance blanche Anomalies oculaires Surdité Caries dentaire Cachexie	- CSA, CSB - XPB, XPD, XPG	- TCR - NER
Syndrome cérébro-oculo-facio-squelettique (COFS)	Ressemble au CS avec des anomalies viscérales	- CSB - XPD, XPG - ERCC1	- TCR - NER - NER
Syndrome de sensibilité aux UV (UVSS)	Photosensibilisation	- CSB - Autres?	-TCR
Trichothiodystrophie (TTD), PIBIDS, IBIDS, BIDS	Photosensibilisation Ichtyose Cheveux cassants (Brittle hair) Diminution de la fertilité Taille réduite (Short stature)	-TTD-A, XPB, XPD	-TCR, Transcription ?

Tableau 2 : Maladies associées à des mutations des gènes du NER.

Des mutations des gènes du NER sont responsables de différentes pathologies qui peuvent induire une photosensibilisation majeure aux UV solaires. Les patients XP présentent particulièrement des affections cutanées dans les régions exposées au soleil et ont un risque extrêmement élevé de développement de cancers cutanés. Le syndrome de Cockayne entraîne une photosensibilisation mais correspond plus à une maladie développementale dont les formes les plus sévères peuvent être létales en période néonatale. Le COFS est une pathologie ressemblant au CS avec des anomalies congénitales des viscères (reins en fer à cheval). L'UVSS, où des mutations de *CSB* inhibent l'expression de la protéine, est une maladie caractérisée par une photosensibilisation et un risque de développement de cancers cutanés de gravité intermédiaire comparé au XP. La TTD est associée à différentes entités cliniques dont le PIBIDS où les patients présentent un symptôme de photosensibilisation (Adapté à partir de réf. [218]).

l'inactivation de la polymérase translésionnelle η). Plusieurs mutations de ces gènes ont été identifiées dans des maladies héréditaires autosomiques récessives rares de la réparation de l'ADN telles que ; le Xeroderma Pigmentosum (XP), le Syndrome de Cockayne (CS) et la Trichothiodystrophie (TTD) (**Tableau 2**). Ces pathologies induisent chez les personnes atteintes une hypersensibilité aux UV et généralement un risque élevé de développement de cancers à un âge précoce. Les patients XP ont ainsi un risque mille à deux mille fois supérieur aux sujets non atteints de XP de développer des cancers cutanés qui incluent les carcinomes et les mélanomes [^{50-52,218}].

2.3.1. Mécanisme de la réparation par excision de nucléotides (NER)

La réparation NER comprend deux sous voies de réparation ; la voie du TCR (Transcription Coupled Repair) qui permet de réparer les zones transcriptionnellement actives du génome et, la voie du GGR (Global Genome Repair) associée à la réparation des zones peu actives. Les deux sous-voies utilisent une stratégie commune et sont différenciables uniquement dans l'étape de reconnaissance des dommages à l'ADN. Le NER comprend plusieurs étapes séquentielles (**Figure 13**) ; la reconnaissance des dommages, l'ouverture de l'hélice d'ADN (ou création d'une bulle de dénaturation), l'excision du brin d'ADN de part et d'autre de la lésion (jusqu'à 32 nucléotides) et le relargage de la partie excisée qui crée un "gap", le remplissage du "gap" par l'insertion d'une nouvelle séquence nucléotidiques, et enfin la ligation du brin nouvellement synthétisé [²¹⁸].

- Reconnaissance de la lésion à l'ADN et initiation du NER

Dans le GGR, la reconnaissance du brin lésé est assurée par la protéine XPC qui en se fixant sur le brin intact en face de la lésion est l'élément initiateur du GGR [^{219,220}]. Cette dernière forme le complexe XPC, avec deux autres protéines HR23B et Centrine 2. Ces protéines augmentent l'affinité d'XPC pour les lésions et son activité dans le NER [^{221,222}]. Lorsque les lésions sont peu distordantes, un deuxième complexe peut intervenir pour optimiser la fixation du complexe XPC. Dans ce cas, le complexe DDB1/DDB2-XPE, qui possède une forte affinité pour l'ADN lésé permet le recrutement de XPC. Le complexe DDB1/DDB2 est associé à des complexes multienzymatiques lui conférant une activité ubiquitine ligase E3 qui lui permettent de poly-ubiquitiner XPC et d'augmenter son affinité pour la lésion [²²³]. L'intervention des protéines DDB1 et DDB2 est particulièrement critique pour la reconnaissance des CPD qui sont des lésions peu distordantes par rapport aux 6-4PP [⁴⁹].

Dans le TCR, la reconnaissance des lésions s'opère par le blocage de l'ARN polymérase II et le recrutement des complexes CSA et CSB aux sites lésionnels [²²⁴]. Ces protéines auraient un rôle important dans l'initiation du TCR et l'efficacité de la réparation des dommages à l'ADN causées par les UV [^{225,226}].

- Excision de la lésion et remplacement de la séquence d'ADN lésée

L'étape d'excision implique la formation séquentielle sur le site des lésions d'un premier complexe formé des protéines, XPC-HR23B-Centrine 2 (pour le GGR) et

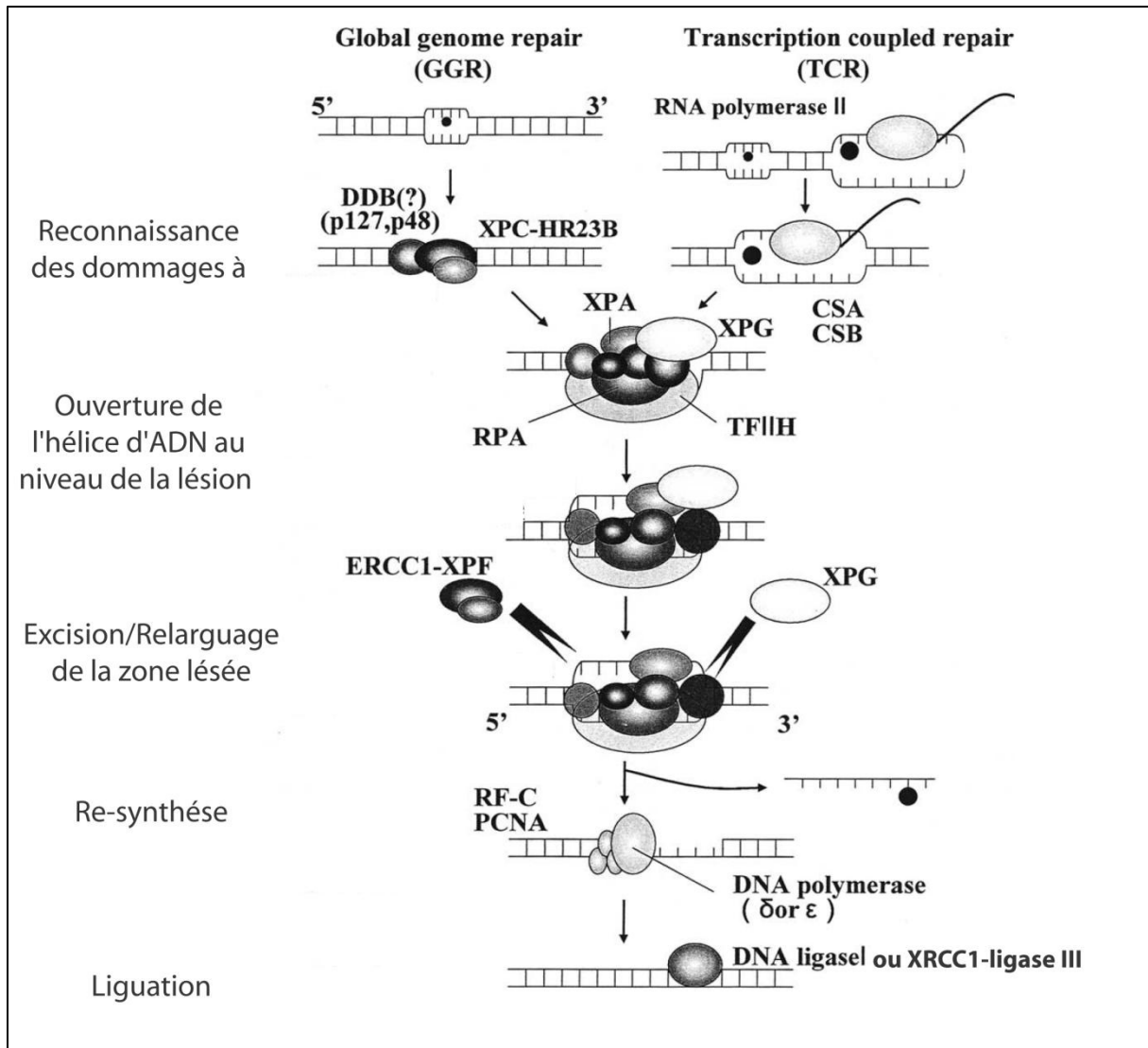


Figure 13 : Réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER).

La réparation de l'ADN par NER comprends deux sous voies qui permettent de réparer les zones de l'ADN non transcriptionnellement actives (GGR) et les zones transcriptionnellement actives (TCR). Dans le GGR la reconnaissance des lésions de type 6-4PP fait intervenir le complexe XPC-HR23B-centrine2 ou, lorsque les lésions sont peu déformantes comme c'est le cas pour les CPD, une étape préalable faisant intervenir le complexe DDB1/DDB2. Dans le TCR, la reconnaissance des lésions s'opère par le blocage de la progression de l'ARN pol II aux sites lésionnels et la fixation des protéines CSA et CSB. La reconnaissance des lésions permet dans les deux cas le recrutement du complexe TFIIH-XPA-RPA qui permet d'ouvrir l'hélice d'ADN. L'excision de la lésion s'effectue par le recrutement et l'action des complexes XPG et XPF-ERCC1. Le fragment lésé, qui est écarté, est ensuite re-synthétisé par l'intermédiaire des complexes RFC-PCNA et les ADN polymérases δ/ε. La ligation s'effectue enfin par le biais de l'ADN ligase I (cellules quiescentes) ou du complexe XRCC1-ligase III (cellules proliférantes) (Schéma adapté à partir de réf. [227]).

XPA-RPA (pour le TCR), qui permettrait d'orienter la fixation du complexe TFIIH [223]. Le complexe TFIIH comprend deux sous-unités XPB et XPD qui possèdent des activités hélicases de sens opposées et des activités ATPases [228,229]. Ces activités ATPase et hélicase permettent au complexe TFIIH d'ouvrir l'hélice d'ADN et de créer une "bulle" d'une trentaine de nucléotides encadrant la lésion d'ADN [230]. Les protéines RPA permettent ensuite le recrutement du deuxième complexe formé des protéines XPG et XPF-ERCC1 qui ont une activité endonucléase respectivement en 3' et en 5' sur le brins d'ADN lésé [231,232]. Le fragment d'ADN lésé est ensuite écarté pour laisser place à la fixation des ADN polymérases δ/ϵ , [233] et au complexe RFC-PCNA [234] qui permettent la synthèse d'une nouvelle séquence nucléotidique. Enfin le complexe XRCC1-ligase III, dans les cellules qui se répliquent activement ou l'ADN ligase I, dans les cellules quiescentes permettent de lier le fragment néosynthétisé [235].

2.3.2. Régulation du NER à la suite de l'exposition UV

Dans les cellules de mammifère, la protéine p53 jouerait un rôle crucial dans la régulation du NER en réponse à l'exposition UV. Il a été montré que la déficience en protéine p53 dans les cellules issues de patients atteints du syndrome de Li-Frauméní (Chap.3, sect.1.1-2), ou après extinction par infection par le papillomavirus E6 ou le virus SV40 altérerait l'efficacité de réparation des lésions de types CPD et 6-4PP [236-241]. Dans ces études, la protéine p53 aurait un rôle prépondérant dans le GGR. D'autres études suggèrent que l'implication de p53 dans la régulation UV induite du NER passerait par le contrôle de l'expression de *DDB2* et *XPC*, deux gènes cruciaux dans le GGR [242-245]. Néanmoins, l'implication de p53 ne serait pas limitée au GGR et influencerait également le TCR. Dans ce cadre il a été montré que l'influence de p53 était corrélée à la longueur d'onde des UV utilisés pour irradier les cellules. Ainsi la perte de p53 affecte à la fois le TCR et le GGR en réponse aux UVB mais uniquement le GGR en réponse aux UVC [246]. Cette participation de p53 pourrait faire également appel à la régulation de PCNA qui intervient dans la voie commune au TCR et au GGR mais cette piste reste encore discutée.

Très récemment, il a été montré que les voies GGR et TCR pouvaient être également modulées par d'autres facteurs de transcription. En réponse à l'exposition UV, *in vivo* et *in vitro*, l'activation du facteur de transcription USF1 particulièrement, est importante pour la régulation transcriptionnelle des gènes *CSA* et *HR23A*. Ce mécanisme, indépendamment de la protéine p53, est particulièrement important pour la réparation des lésions de type CPD induites par les UVC [226].

La régulation du NER en réponse à l'exposition UV ferait également intervenir des interactions protéines-protéines et des modifications post-transcriptionnelle de ces composants qui moduleraient alors l'activité du NER. Après irradiation UV, il a été montré que les protéines DDB2 et XPC sont co-localisées sur l'ADN lésé. Dans ce cas, la fixation de DDB2 préliminaire est nécessaire pour le recrutement successif de XPC sur l'ADN lésé [244]. D'autres parts, il a également été montré que la protéine DDB2 faisait partie d'un complexe composé des protéines DDB1, Culine 4A, Roc1 et du signalosome COP9. Ce complexe, doté d'activité ubiquitine ligase E3, est activé en réponse aux UV et permet de polyubiquitiner à la fois DDB2 et XPC. La

polyubiquitination d'XPC permet son association à l'ADN lésé et favorise l'activité du NER alors que la polyubiquitination de DDB2 entraîne sa dégradation. Ce mécanisme utilisant un signal de polyubiquitination permettrait la reconnaissance UV induite de la lésion à l'ADN et l'activation du GGR [223,225].

Pour conclure, cette partie montre le caractère crucial de la réparation NER, ces spécificités mais également la complémentarité des sous-voies GGR et TCR. L'absence de tels mécanismes de réparation conduit à une hypersensibilité aux UV dont l'apoptose est alors une dernière barrière contre l'instabilité génomique.

2.4. L'apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort programmé qui constitue un des derniers remparts contre l'initiation de la transformation des cellules cutanées exposées aux UV. Particulièrement, l'apparition de kératinocytes à noyaux pyknotiques avec des cytoplasmes rétractés, dénommés "sunburn cells", au niveau des régions suprabasale et médiane de l'épiderme, est reconnue depuis longtemps comme un des événements les plus caractéristiques de la protection contre les effets mutagènes des UV [247-249]. Il est à noter que la relative résistance à l'apoptose de certaines cellules dites résidentes telles que les cellules souches kératinocytaires ou les mélanocytes de par leur niveau basale élevé de protéine anti-apoptotique Bcl-2 est un élément propice à la transformation cellulaire [69,250-252]. Par ailleurs, les cellules résidentes de l'épiderme ne sont pas toutes résistantes à l'apoptose. Ainsi, les cellules de Langherans sont sensibles à l'effet pro-apoptotique des UV mais cette sensibilité apparaît plus comme un effet délétère des UV de par son implication dans les mécanismes d'immunosuppression [253-255].

2.4.1. Mécanisme général de l'apoptose

Le mécanisme général de l'apoptose met en jeu des cystéines protéases dont l'activation par clivage protéolytique permet une dégradation de plusieurs substrats cellulaires. Cette cascade protéolytique aboutit à un désassemblage de la cellule sous-forme de corps apoptotiques phagocytés par les cellules immunitaires. L'activation de l'apoptose peut faire intervenir deux voies (**Figure 14A et B**) ;

- La voie extrinsèque (**Figure 14A**) fait appel à l'activation des récepteurs membranaires de mort. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des TNFR (dont TNFR-1, TRAIL-R1 et R2 et FAS/Apo-1/CD95) qui se caractérise par une région extracellulaire riche en cystéine et une région cytoplasmique homologue appelée domaine de mort (DD). Ces derniers sont activés typiquement après fixation de leurs ligands (dont le TNF et la lymphotoxine α , Apo-2L et CD95L) qui causent leurs trimérisation et le recrutement aux DD de la protéine adaptatrice FADD. La protéine FADD permet en retour, le recrutement des caspases initiateuses 8 et 10 dont le clivage permet l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7 [256,257].

- La voie intrinsèque (**Figure 14B**) met en jeu la modulation de la perméabilité membranaire de la mitochondrie par l'intermédiaire des protéines de la famille Bcl2. Ces dernières peuvent avoir des effets pro-apoptotiques (dont Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid, Puma, Noxa) ou anti-apoptotiques (dont Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1). Le ratio cellulaire entre ces protéines détermine la formation ou non de pores au niveau de la mitochondrie et le relargage du cytochrome c qui permet la formation de l'apoptosome. Ce dernier formé de l'Apaf-1, d'ATP et du cytochrome c va activer la pro-caspase 9 qui permet l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7 [257,258].

Enfin, il est à noter que la voie intrinsèque peut également être activée par la voie extrinsèque par le biais du clivage de Bid par la caspase 8 en t-Bid qui va ensuite agir sur la mitochondrie [257].

2.4.2. Activation de l'apoptose par les UV

L'analyse de l'apoptose UV induite dans plusieurs modèles, et particulièrement les kératinocytes, ont permis d'identifier une participation complémentaire et non mutuellement exclusive des deux voies apoptotiques [253,259]. Dans ces processus, l'activation de l'apoptose fait intervenir la protéine p53 de façon importante si bien que l'on détermine classiquement une activation indépendante de p53 et une autre dépendante du suppresseur de tumeur (**Figure 15**).

- Activation indépendante de p53

L'activation de l'apoptose indépendamment de la protéine p53 fait intervenir la voie extrinsèque et la modulation de l'activité des récepteurs CD95 et TNFR1. Comme pour l'EGFR (Chap.1, sect.2.1.3.), l'activité de ces récepteurs peut être régulée directement par les UV de façon ligand indépendante mais également par l'intermédiaire de la régulation de l'expression des récepteurs et/ou des ligands (**Figure 15**).

De façon ligand indépendante, il a été notamment montré que les récepteurs CD95 et TNFR1 étaient constitutivement exprimés par les kératinocytes normaux et pathologiques. Dans ces modèles, les UV sont capables d'induire l'agrégation (ou clustering) membranaire de ces deux types de récepteurs et d'activer la voie extrinsèque de l'apoptose [260-263]. D'autre part, dans les kératinocytes mais également d'autres modèles d'études, il a été montré que l'activation des récepteurs CD95 et TNFR1 en réponse aux UV pouvait également recourir à l'augmentation de l'association ligands-récepteurs. Ainsi, les expressions de CD95, CD95L et du TNF- α peuvent être induites par l'exposition UV et, l'association des couples ligands-récepteurs, participer à l'induction de l'apoptose extrinsèque [261,264-266].

L'activation des récepteurs de mort n'est pas le moyen exclusif d'activation de l'apoptose intrinsèque qui pourrait également être induite de manière p53 indépendante (**Figure 15**). Dans ce sens, différentes études montrent une diminution de la quantité de protéine Bcl2 au niveau protéique qui aurait une relevance *in vivo*, cependant, les mécanismes de régulation de l'expression de Bcl2 en réponse au UV ne sont pas étayés [267-269]. D'autre part, il a été montré que les

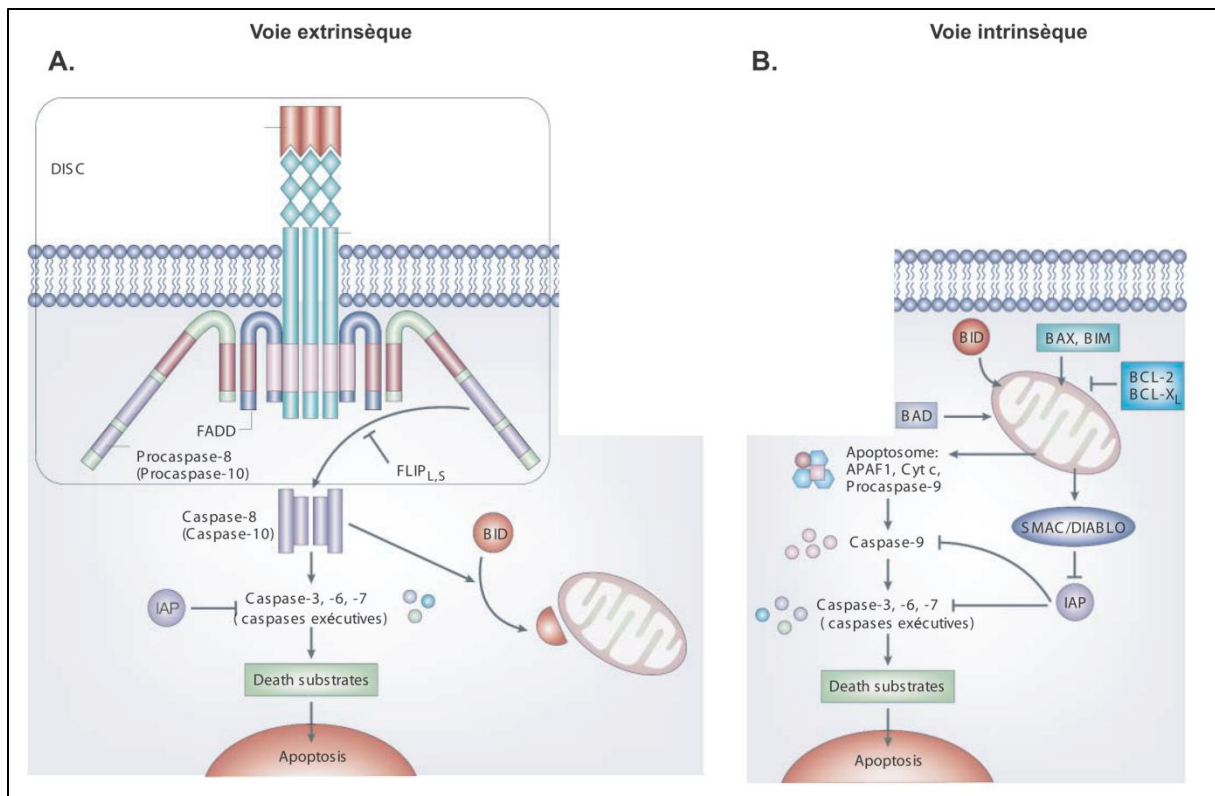


Figure 14 : Mécanisme générale de l'apoptose.

A. Voie extrinsèque de l'apoptose dépendante de l'association des récepteurs de mort et de leurs ligands. Celle-ci entraîne la formation du complexe DISC par l'intermédiaire du recrutement de la protéine adaptatrice FADD. Cette voie peut être inhibée par les protéines FLIP qui contrecarrent la formation du DISC et l'activation de la caspase 8. B. Voie Intrinsèque dépendante de la modulation de la balance entre les protéines pro-apoptotiques (exemple de Bax ou Bim) et anti-apoptotiques (exemple de Bcl-2 ou Bcl-XL) de la famille Bcl2. Cette balance influence la perméabilité membranaire de la mitochondrie et le relargage du cytochrome ce qui permet la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9. Les deux voies utilisent les mêmes caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7). La voie extrinsèque peut être activée par la voie intrinsèque par le biais de la protéine Bid qui assure le crosstalk entre les deux voies. De nombreuses autres protéines interviennent dans la régulation de l'apoptose dont les IAP, des protéines inhibitrices (comme la survivine). Les IAP sont elles-mêmes régulées négativement par des facteurs relargués par la mitochondrie comme la protéine SMAC/DIABLO (Adapté à partir de réf. [257]).

UV pouvaient moduler, probablement *via* le stress oxydant généré, la structure de la membrane mitochondriale et entraîner spécifiquement le relargage du cytochrome c indépendamment de la balance Bax-Bcl2 [270,271]. Ce mécanisme très rapide permettrait d'activer l'apoptose *via* la formation de l'Apaf-1. D'autre part, il interviendrait également sur la modulation du potentiel de la membrane mitochondriale par l'intermédiaire du clivage des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl2 résultant en l'amplification de l'apoptose intrinsèque [272].

- Activation dépendante de p53

La protéine p53 est particulièrement impliquée dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques (**Figure 15**). Parmi ces derniers figurent des récepteurs de morts mais également plusieurs membres de la famille Bcl2 [273]. L'importance de p53 dans l'apoptose UV induite est illustrée par les effets de l'inactivation de p53 qui cause une diminution conséquente du nombre de kératinocytes apoptotiques et favorise la formation de kératoses actiniques, stade pré-tumorale, après l'exposition UV *in vivo* [249,266]. Néanmoins, l'influence de p53 dans l'apoptose semble être dépendante du type cellulaire, de son potentiel prolifératif et de sa capacité de réparation des dommages à l'ADN. Ainsi dans les cellules cutanées, les cellules souches kératinocytaires sont moins sensibles à l'apoptose et ont des capacités de réparation des dommages à l'ADN plus importante que les cellules à amplification transitoire [251,252,274,275]. D'autre part, des déficits dans le système de réparation NER peuvent considérablement augmenter la sensibilité à l'apoptose p53 dépendante [268].

L'étude des modèles murins déficients pour *PUMA* et *NOXA* révèle un rôle critique de ces deux gènes dans l'apoptose dépendante de p53 en réponse à plusieurs agents endommageant l'ADN dont les UV [276-278]. Ces derniers interagissent avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL au niveau de la mitochondrie et provoquent l'activation de l'apoptose. *In vitro*, il a été montré que la régulation de l'expression de *PUMA* et *NOXA* pouvait particulièrement dépendre de l'activation de la protéine p53 par la kinase p38 [279].

En réponse à l'exposition UV, la protéine p53 ne serait pas responsable que de l'activation de facteurs pro-apoptotiques mais régulerait également des facteurs anti-apoptotiques. Ainsi, l'expression de la survivine est inhibée par l'activation de p53 [280].

Dans la peau, et particulièrement dans kératinocytes proliférants, l'action pro-apoptotique de p53 dépendrait crucialement de l'inhibition de l'expression du facteur de transcription $\Delta Np63\alpha$ fortement exprimée dans ces cellules [8]. Ce facteur de transcription correspond à une des isoformes de la protéine p63 (qui appartient à la famille p53) qui est dépourvue de domaine de transactivation. Cette protéine agit comme un dominant négatif de p53 [281]. En réponse aux UV, il a été montré *in vivo* et *in vitro* que l'expression de $\Delta Np63\alpha$ devait être réprimée par GADD45, une cible de p53, afin de permettre l'activation de l'apoptose p53 dépendante [282-284].

Enfin, de façon indépendante de la transcription, plusieurs études mettent en évidence une activation de l'apoptose par translocation de p53 du noyau vers la

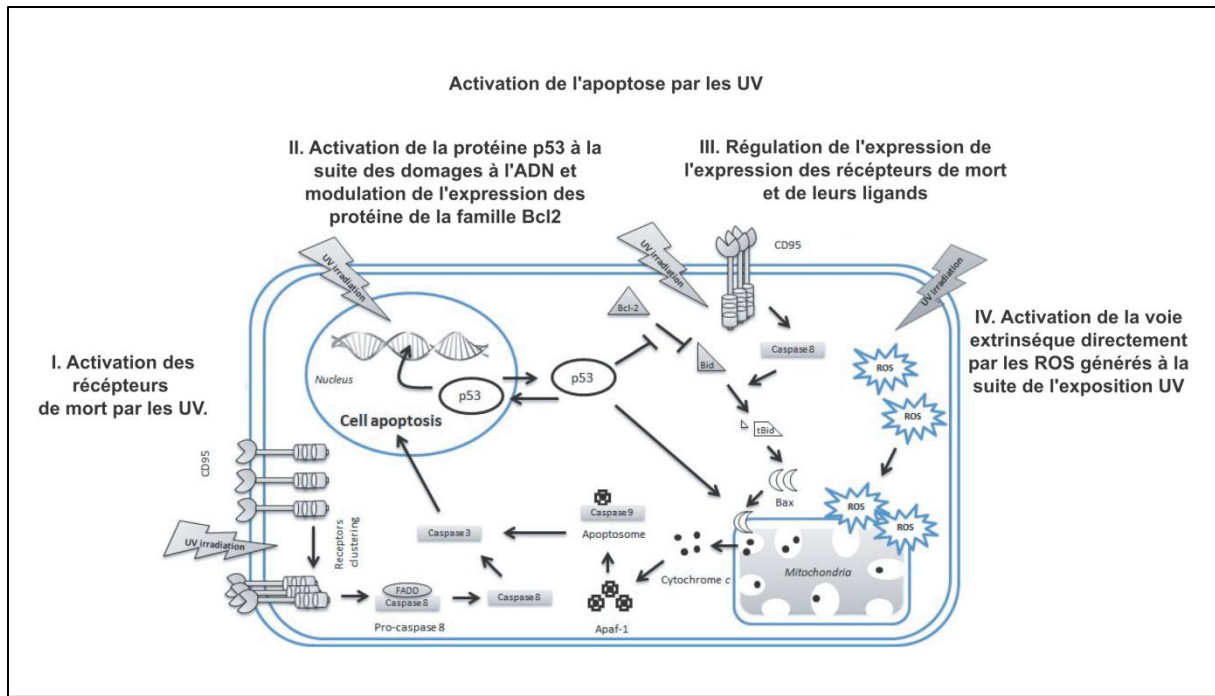


Figure 15 : Activation de l'apoptose en réponse aux UV.

En réponse à l'exposition, UV l'apoptose peut être induite par l'activation des voies extrinsèques et intrinsèques. Le clustering des récepteurs de mort (comme le CD95) de manière ligands indépendante (I) ou par l'intermédiaire de la néosynthèse des récepteurs ou des ligands (III) conduit à l'activation de l'apoptose extrinsèque. L'activation de la protéine p53 en réponse aux dommages à l'ADN (II) permet la régulation transcriptionnelle de facteur pro-apoptotique (PUMA, NOXA) mais réprime également des facteurs anti-apoptotiques (la survivine). La voie intrinsèque pourrait également être activée de manière directe (IV) par l'augmentation de la perméabilité membranaire par le biais des ROS générés par l'exposition UV (Adapté à partir de réf. [24,269]).

mitochondrie en réponse aux dommages à l'ADN. Dans ce mécanisme, p53 pourrait agir directement en formant un complexe avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-XL et Bcl-2 et promouvoir directement l'apoptose [285]. Ce mécanisme a été démontré sous l'effet des radiations gamma et reste à être confirmé dans des les modèles cellulaires cutanés exposés aux UV

Cette partie nous a permis d'appréhender les mécanismes régulant l'apoptose en réponse à l'exposition UV. Nous avons vu que ce mécanisme, considéré comme un dernier rempart à l'instabilité génomique, était dépendant de plusieurs voies dans lesquelles le suppresseur de tumeur p53 joue un rôle décisif. Dans la partie suivante nous nous attèlerons à décrire les mécanismes régissant la pigmentation UV inductible qui correspondent à une réponse cellulaire tardive qui peut s'apparenter à une forme d'adaptation au stress UV.

3. Réponse tardive

3.1. La pigmentation

La pigmentation de la peau, qu'elle soit constitutive (basale ou innée) ou facultative (activée par les UV), contribue de façon importante à la protection du génome contre les effets délétères des UV [92,152,286,287]. Cette protection est par ailleurs bien illustrée par la corrélation inverse qu'il existe entre la pigmentation des individus et le facteur de risque de développement de cancers cutanés associés à l'exposition UV [22,23,93]. Les sujets de phototype les plus sombres présentent un niveau de lésions à l'ADN moins important que les sujets à peau claire pour une même exposition aux UV et, leur aptitude à "bronzer" diminue le niveau de dommages à l'ADN après une exposition répétée aux UV [153,157,287,288]. Les propriétés photo-protectrices de la pigmentation sont imputables à la structure de la mélanine qui absorbe les rayonnements UV et qui les dissipe sous forme de chaleur. D'autre part, la mélanine se comporte comme un antioxydant qui neutralise les ROS générées à la suite de l'exposition UV [289,290].

3.1.1. Synthèse basale de la mélanine

La mélanine est un polymère insoluble non protéique issu de la polymérisation de sous-unités produites à partir de l'oxydo-réduction de la L-tyrosine (**Figure 16A**). Les mammifères produisent deux types de mélanine, l'eumélanine de couleur marron/noire et la phéomélanine de couleur rouge/orange. Alors que l'eumélanine est photo-protectrice, la phéomélanine n'assure aucune protection [291]. Les deux types de pigments coexistent dans un même mélanocyte mais dans des mélanosomes différents. Le ratio eumélanine/phéomélanine est déterminant dans la couleur des individus. Ainsi, les individus à peau noire présentent une quantité d'eumélanine importante par rapport aux individus à peau blanche [292-296].

La synthèse des deux types de mélanine dépend de la régulation de la voie de la mélanogénèse dont l'enzyme limitante est la tyrosinase (TYR) (**Figure 16A**). Cette

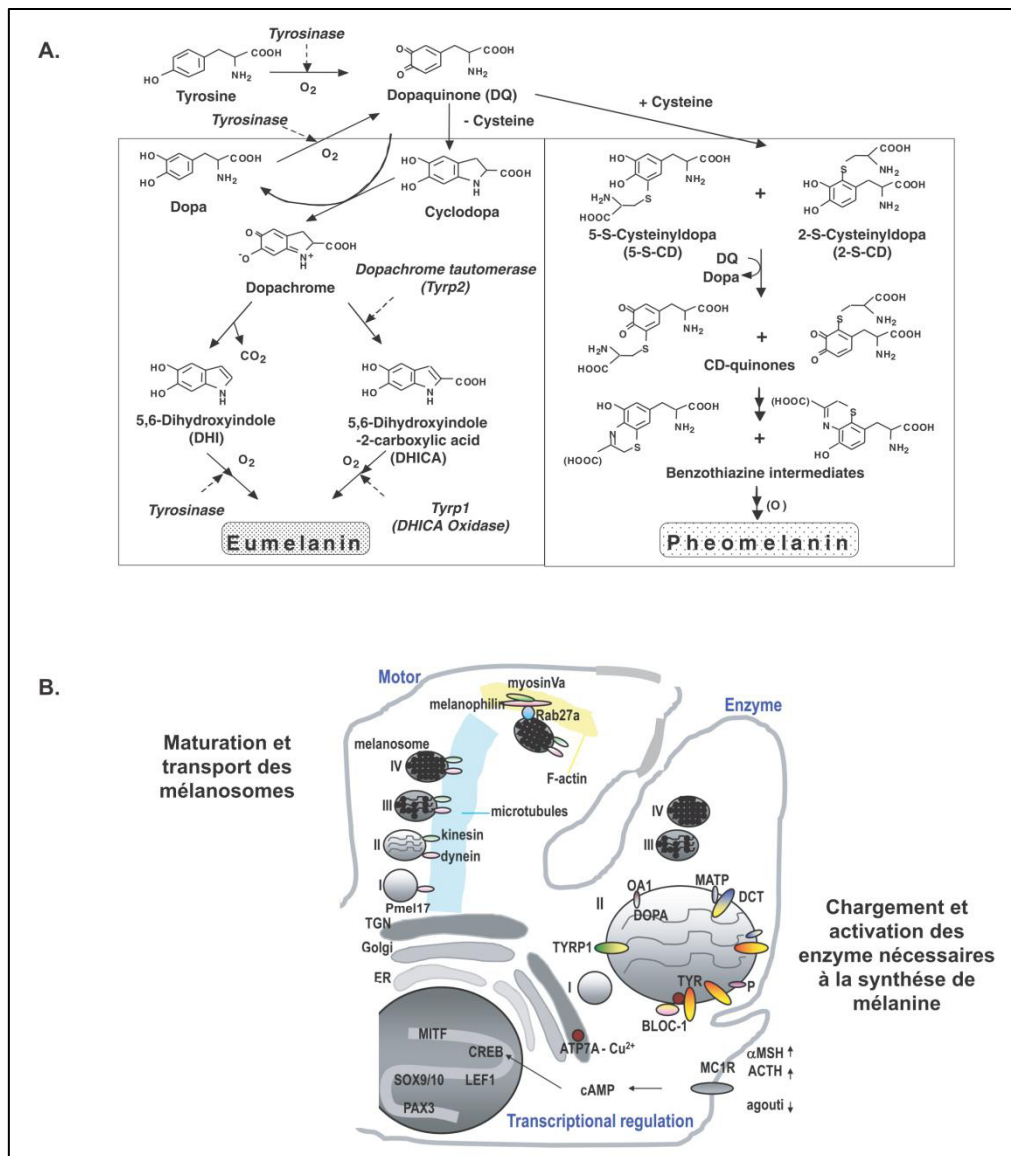


Figure 16 : Synthèse de la mélanine et formation des mélanosomes.

A. La mélanine comprend deux types de pigment, l'eumélanine de couleur noire/marron (polymère de DHI et DHICA) et la phéomélanine de couleur jaune/orangé. Les deux pigments sont synthétisés à partir d'un précurseur commun, la L-tyrosine à partir de l'enzyme limitante TYR mais seul l'eumélanine est dotée de propriété photoprotectrice. L'orientation vers l'un des pigments est influencée par la disponibilité en cystéine et de l'activité des enzymes TYRP-1 et DCT (TYRP-2) (Schéma tiré de réf. [297]). B. La mélanine est formée dans les mélanosomes en plusieurs stades. Les mélanosomes de stades I contiennent la protéine Pmel17 dont les propriétés amyloïdogènes permettent l'accumulation de dépôts de mélanine. La formation de la mélanine commence lorsque les enzymes de la mélanogenèse (TYR, TYRP-1 et DCT) sont inclus dans les mélanosomes de stade I pour former les mélanosomes de stade II. Les stades III et IV correspondent à l'accumulation de mélanine et l'inhibition de l'activité de TYR respectivement. La prise en charge des mélanosomes et leurs transferts vers les extrémités dendritiques par l'intermédiaire du cytosquelette sont assurés par les protéines; Rab27, la mélanophiline, la myosine VA, la dynéine et la kinésine (Adapté à partir de réf. [298]).

enzyme, dont les mutations sont associées à l'albinisme oculocutané sévère de type IA (OCA1), permet séquentiellement l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-DOPA et l'oxydation de la L-DOPA en DOPAquinone [299-303]. L'orientation de la synthèse de l'eumélanine plutôt que de la phéomélanine est influencée par la faible disponibilité en cystéine et de glutathione, pourvoyeurs de soufre [304]. D'autres parts, certaines étapes de la synthèse de l'eumélanine peuvent se faire spontanément ou faire intervenir d'autres enzymes dont ; la DOPACHrome tautomérase (DCT ou TRP-2) et la DHICA oxydase (TRP-1). Ces enzymes, dont les déficiences sont également à l'origine de désordres pigmentaires, potentialisent l'activité de la tyrosinase et la formation d'eumélanine [305-308].

3.1.2. Maturation des mélanosomes

La formation de la mélanine se matérialise par les différents stades de maturation des mélanosomes (**Figure 16B**).

Les pré-mélanosomes qui sont issus des endosomes précoces se caractérisent par leur contenu en glycoprotéine Silver/PMEL17. Cette dernière, dotée de propriétés amyloïdogènes, permet après clivage protéolytique par des convertases de former une matrice fibrillaire pour l'arrimage des dépôts de mélanine nécessaire à la formation des mélanosomes de stade II [309-311]. Les mélanosomes de stades II sont ensuite fusionnés par l'intermédiaire de protéines cargo de la famille des protéines adaptatrices AP avec d'autres endosomes contenant les enzymes de la mélanogénèse [13,14,308,312]. La présence d'ions cuivre dans le milieu des mélanosomes de stade II permet d'amorcer l'activité de la tyrosinase et la production de mélanine dans le stade III. Le stade IV est caractérisé par le remplissage complet du mélanosome par des dépôts de mélanine et l'inactivation de la tyrosinase [303,313].

3.1.3. Transfert des mélanosomes aux kératinocytes

Le transfert des mélanosomes vers les kératinocytes est un phénomène coordonné et séquentiel qui implique les deux types cellulaires.

Une première étape correspond en la prise en charge du mélanosome dans le mélanocyte par un complexe protéique permettant de capturer et d'acheminer le mélanosome *via* les filaments d'actine et les microtubules, vers l'extrémité des dendrites [13,294] (**Figure 16B**). Ce complexe comprend les protéines ; Myosine VA, la mélanophiline et les petites protéines G, particulièrement Rab27A [298]. L'activation de Rab27A présent à la membrane du mélanosome initie, par des voies dépendantes de l'AMPc, la formation de ce complexe [314-318]. D'autres protéines associées à ce complexe, notamment la dynéine, assurent alors l'orientation du mélanosome vers l'extrémité des dendrites [319].

La deuxième étape du processus, encore mal connue correspond à la capture des mélanosomes par le kératinocyte qui peut être induite par différents moyens dont ; la

cytophagocytose, la phagocytose et/ou l'endocytose [13,15,308]. La phagocytose par le kératinocytes de mélanosomes exocytés par les mélanocytes apparait comme un des moyens les plus importants [320]. Dans ce mécanisme, la régulation de l'activité de PAR-2, un récepteur à sept passages transmembranaires couplé aux protéines G spécifique du kératinocyte, est primordiale. L'activation de ce récepteur est produite par clivage protéolytique de son extrémité extracellulaire libérant un peptide se comportant comme le ligand du récepteur. Le récepteur activé initie ensuite *via* la protéine Rac et de manière AMPc dépendante, le remaniement du cytosquelette d'actine du kératinocyte et la phagocytose des mélanosomes présents dans l'espace intercellulaire [318,321-323].

3.2. Régulation de la pigmentation basale

La pigmentation basale et sa régulation impliquent de nombreux facteurs sécrétés localement de façon autocrine et paracrine (**Figure 17**). Parmi ces facteurs, les dérivés de la pro-opiomélanocortine (POMC) et de nombreux facteurs de croissance dont les endothélines, le steel factor et le FGF basique jouent un rôle important dans la mélanogenèse [294]. Ces différents facteurs peuvent être synthétisés par les mélanocytes et les kératinocytes mais également d'autres types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires [298]. L'ensemble de ces facteurs vont agir sur la différenciation du mélanocyte *via* de nombreux récepteurs présents à sa surface. Au niveau du mélanocyte les voies cellulaires initiées par ces récepteurs visent à réguler majoritairement l'expression des enzymes nécessaires à la pigmentation dont ; la *TYR*, la *TRP-1* et la *DCT* [294,295,306]. De manière importante, un déterminant commun des gènes codants pour ces enzymes est leur contrôle transcriptionnel par le facteur de transcription MITF, particulièrement l'isoforme MITF-M, qui joue un rôle primordial dans le développement et la différenciation du mélanocyte [304,324]. Ainsi, la régulation de l'expression et de l'activité de MITF-M par les dérivés de POMC et les facteurs de croissance sécrétés localement est un élément prépondérant de la mélanogenèse constitutive (**Figure 17**).

3.2.1. Les dérivés de la pro-opiomélanocortine (POMC), l' α -MSH, l'ACTH et le récepteur MC1R

La POMC est synthétisée constitutivement dans la peau [325] majoritairement par les kératinocytes et les mélanocytes [326-328]. Dans ces cellules la POMC subit un clivage protéolytique par les convertases qui génèrent, l' α -MSH, le β -MSH, le γ -MSH, l'ACTH et le β -endorphine qui sont sécrétés dans le milieu extracellulaire [325,329].

L' α -MSH et l'ACTH sont des ligands capables de se fixer et d'activer le récepteur membranaire MC1R exprimé par les mélanocytes. MC1R est un récepteur à sept passages transmembranaires couplé aux petites protéines G. Son activation permet les recrutements de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc mais également de la phospholipase C et la production de DAG [330,331]. L'AMPc et le DAG sont des

seconds messagers important dans l'induction de la mélanogenèse par l'intermédiaire de l'activation des protéines kinases A (PKA) et C (PKC) respectivement [332-335] (**Figure 17**).

Particulièrement étudiée la phosphorylation du facteur de transcription CREB par la PKA, permet la fixation de Phospho-CREB au niveau du promoteur du gène MITF et l'expression de l'isoforme MITF-M [324,336]. MITF-M régule alors l'expression des gènes *TYR*, *TYRP-1* et *DCT* qui participent à la synthèse de la mélanine [337,338]. L'induction de MITF ne conduit pas uniquement à l'expression des enzymes de la mélanogenèse mais active également de manière transcriptionnelle l'expression du récepteur MC1R de manière à renforcer la pigmentation [339].

Parallèlement à cette voie, l'activation de la PKC, mal connue, permettrait d'augmenter par phosphorylation l'activité transcriptionnelle de MITF et l'activité enzymatique de la tyrosinase assurant ainsi un maintien de la pigmentation [294,332,340,341].

3.2.2. Les endothélines et leurs récepteurs

Les endothélines (ET-1, ET-2 et ET-3) sont des peptides issus du clivage par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) d'un même précurseur, la préproendothéline [294]. Celui-ci est constitutivement exprimé dans la peau par les cellules endothéliales, les kératinocytes et les fibroblastes [342-344]. Les endothélines sont sécrétées dans le milieu extracellulaire et se lient aux récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux petites protéines G, ET_A et ET_B [140,141].

Le récepteur ET_B particulièrement exprimé à la surface des mélanocytes permet, après liaison des endothélines [344,345], d'initier différentes cascades impliquant, les protéines kinase A et C ainsi que les MAPKs [346] (**Figure 17**). L'activation de la voie PKA permet comme pour le récepteur MC1R ; de phosphoryler le facteur de transcription CREB, d'augmenter l'expression de MC1R, d'augmenter l'expression de MITF-M et d'activer la pigmentation (Chap.2, sect.3.2.1) [345,347,348]. L'activation de la PKC joue également un rôle en entretenant la pigmentation par la phosphorylation de MITF. Cette phosphorylation renforce l'affinité de MITF pour ses séquences consensus et son activité transcriptionnelle [340,341,346,349]. L'activation de la voie des MAPK par l'endothéline permet ; d'une part, de phosphoryler le facteur de transcription CREB et, d'autre part, de potentialiser par phosphorylation l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription MITF-M [340,348].

3.2.3. Les facteurs de croissance SCF et b-FGF et leurs récepteurs, c-Kit et FGFR

Le SCF et le b-FGF sont des peptides membranaires exprimés constitutivement par les kératinocytes et les fibroblastes. Ces derniers peuvent également être retrouvés dans l'espace extracellulaire après leurs clivages protéolytiques par des

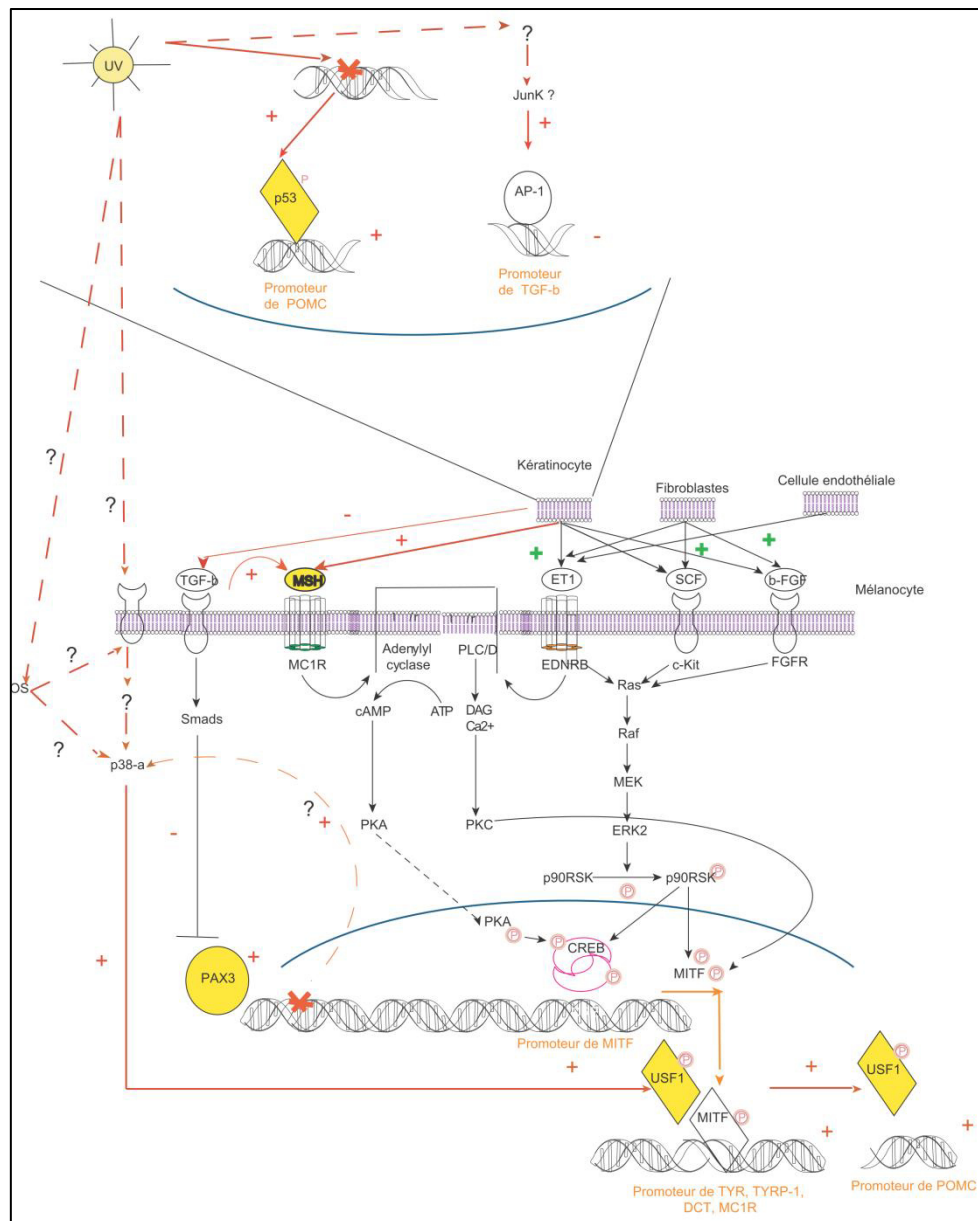


Figure 17 : Régulation de la pigmentation constitutive et inducible par les UV.

La pigmentation constitutive dépend de facteurs sécrétés constitutivement par les cellules cutanées. Les mélanocytes et les kératinocytes synthétisent et sécrètent les dérivés de la POMC dont l' α -MSH et l'ACTH. En se fixant sur le récepteur MC1R présent à la membrane du mélanocyte, ces ligands induisent l'activation de la PKA et de la PKC qui permettent respectivement d'induire l'expression du facteur de transcription MITF et sa phosphorylation. A son tour MITF induit l'expression des gènes *TYR*, *TRP-1* et *DCT* importants pour la synthèse de mélanine. Les facteurs paracrines dont l'endothéline (ET1/2), le SCF et le FGF sont sécrétés par les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Ces derniers, par l'intermédiaire de la PKC et de la voie des MAPK sont capables *via* leurs récepteurs respectifs de moduler l'expression et l'activité du facteur de transcription MITF. En réponse à l'exposition UV, les voies de la pigmentation constitutive sont exacerbées particulièrement par l'activation des voies p38-USF1 et p53. (Activation par les UV ; + inhibition; - , mécanisme clairement définie **en rouge** ou non **en vert**) (Schéma construit et adapté à partir de réf. [350] et des références du corpus).

métalloprotéases membranaires [294,349,351,352]. Ces ligands agissent sur leurs récepteurs respectifs qui sont des récepteurs à activité tyrosine kinase. Les récepteurs c-kit et FGFR sont exprimés par les mélanocytes. Après association de leurs ligands, la dimérisation des récepteurs conduit majoritairement à l'activation de la voie des MAPK (**Figure 17**). Cette voie permet comme dans le cas de l'endothéline de maintenir la survie des mélanocytes et de potentialiser la mélanogenèse *via* l'augmentation de l'expression de MITF et sa phosphorylation (Chap.2, section 3.2.2.) [340,341,346,350,353].

3.3. Induction de la pigmentation en réponse à l'exposition UV

La pigmentation photo-protectrice induite par les UV, qui est également qualifiée de pigmentation retardée, commence environ trois jours après l'exposition [290]. Elle se matérialise majoritairement par une augmentation de l'activité des mélanocytes avec un transfert de la mélanine dans les kératinocytes des couches basale et suprabasale de l'épiderme [153,288]. Cette pigmentation, qui peut se maintenir jusqu'à 3 à 4 semaines après l'exposition initiale aux UV, assure une réelle diminution des dommages à l'ADN après une nouvelle exposition [152]. Ainsi, la sensibilité immédiate de la peau à l'irradiation UV est largement dépendante de la pigmentation constitutive [287,288]. Cela explique également que le risque de développer des cancers de la peau liés à l'exposition UV chez les phototypes foncés (IV et V) soit bien inférieur à ceux des phototypes les plus clairs (I et II) (Chap.1, sect.3.1-2) [22,23,55,92-94,354]. Il est à noter que d'autres types de pigmentation existent. Ces dernières correspondent aux pigmentations dites immédiate et persistante. Ces deux types de pigmentations sont immédiatement développés après l'exposition UV. Elles n'ont pas d'effets protecteurs et correspondent à une oxydation de la mélanine et sa redistribution dans le mélanocyte. Leurs effets se résorbent souvent dans les 3 à 4 jours suivant l'exposition UV [355].

La pigmentation photo-induite correspond à une exacerbation des voies précédemment décrites pour la pigmentation constitutive (**Figure 17**). Elle se manifeste par une augmentation de l'expression de la POMC et de ses peptides dérivés dans les kératinocytes et dans les mélanocytes [326-328,347,356]. Elle s'accompagne également d'une augmentation de l'expression du récepteur MC1R dans le mélanocyte [326,327,347]. La pigmentation UV induite est également provoquée par une augmentation massive de l'expression des facteurs de croissance membranaire ou sécrétée par les kératinocytes, les mélanocytes et les fibroblastes. Cette synthèse intéresse ; l'ET1/2, le SCF et le bFGF mais également leurs récepteurs au niveau du mélanocyte [342-345,347,349,353,357]. Parallèlement, les UV modulent également la dendritogenèse des mélanocytes et le transfert des mélanosomes aux kératinocytes. Cet effet est permis entre autre par ; l'augmentation du clivage de PAR2, l'activation de Rac1 et l'augmentation de l'expression de la dynéine tous majoritairement stimulés par l'augmentation de l' α -MSH dans le milieu extracellulaire [317,319,321,323].

L'ensemble des mécanismes permettant l'induction de la mélanogenèse, notamment la coopération entre les différents types cellulaires, les signaux initiateurs de la mélanogenèse en réponse à l'exposition UV n'est pas complètement élucidé. Pour

autant, une étape initiale importante de la réponse aux UV consiste en l'augmentation de la POMC et la production de ses dérivés, particulièrement l' α -MSH [294]. Ainsi, l' α -MSH de par ses effets pléiotropiques sur l'activation de la dendritogenèse [317–319,322,323], la synthèse de MC1R [326,327,347] et l'expression de certains facteurs de croissance comme l'ET1 [328,343] constitue une amorce importante des effets pro-mélanogéniques médiés par les UV. Dans ce schéma, la pigmentation inductible fait majoritairement intervenir les facteurs de transcription USF1 et p53 (**Figure 17**).

- Le modèle p38-USF1

USF1 est un facteur de transcription ubiquitaire qui appartient comme MTF à la famille des bHLH-LZ. Au niveau du mélanocyte, il a été montré q'USF1 était capable de se fixer aux séquences consensus de type CANNTG qui comprennent les boîtes M et les boîtes E présentes sur les promoteurs des gènes *TYR*, *TRP-1*, *DCT*, *POMC* et *MC1R* [358,359]. Par opposition au facteur de transcription MTF largement impliqué dans la pigmentation constitutive, l'activation d'USF1 est inductible par sa phosphorylation par la kinase de stress p38 α elle même activée à la suite de l'exposition UV [186,187,357,360,361] (**Figure 17**). Ainsi, l'activation d'USF1 par la kinase p38 α permet de réguler transcriptionnellement l'expression des gènes de la pigmentation permettant l'augmentation de la synth-se de la mélanine dans les mélanocytes.

- Le modèle lésions à l'ADN-p53

Si les éléments (intracellulaires et/ou extracellulaires) initiateurs nécessaires à l'activation de la voie pro-mélanogénique p38 α -USF1 en réponse à l'exposition UV ne sont pas connus, les travaux du groupe de Gilchrist ont été les premiers à mettre en évidence un lien entre l'activation de la protéine p53 par les dommages à l'ADN et l'induction de la pigmentation [362–364]. De nombreux gènes dont *TYR*, *TRP-1* et *POMC* possèdent dans leurs promoteurs des séquences consensus pour p53 fonctionnelles [365–367]. En réponse à l'exposition UV particulièrement, il a été montré *in vivo* que l'expression de *POMC* dans les kératinocytes est dépendante de la stabilisation de la protéine p53 en réponse aux dommages à l'ADN (**Figure 17**). La production de l' α -MSH en découlant peut ensuite mobiliser dans les mélanocytes le récepteur MC1R et promouvoir l'induction de l'expression de MTF traditionnellement associé à la pigmentation constitutive [367].

Enfin, Il est à noter que la voie pro-mélanogénique p53-POMC-MTF peut également être amplifiée par l'anti-répression, à la suite de l'exposition UV, de l'expression de PAX3 (**Figure 17**). Ce facteur de transcription est un activateur de l'expression de MTF dans le mélanocyte qui est régulé négativement par le récepteur au TGF β et la voie des protéines Smads. Il a été montré qu'en réponse aux UV, l'inhibition de la sécrétion de TGF β par le kératinocyte bloque l'activation de la cascade des Smads responsable de l'inhibition de l'expression de PAX3 dans le mélanocyte. Au niveau

du mélanocyte, l'augmentation subséquente de PAX3 permet ensuite sa fixation sur le promoteur de MITF et renforce l'expression de MITF et la mélanogenèse [³⁶⁶].

En conclusion de cette partie, nous avons précisé le rôle photoprotecteur important de la pigmentation et sa régulation en réponse au stress. Nous avons particulièrement décrit les rôles primordiaux joués par les facteurs de transcriptions p53 et USF1 dans la pigmentation UV dépendante.

Dans les parties suivantes, nous nous attacherons à montrer les mécanismes permettant de réguler la disponibilité de la protéine p53 qui est capitale dans la prévention de l'instabilité génomique promue par les UV. Dans un deuxième temps nous préciserons les rôles pléiotropiques joués par USF1 qui suggèrent ce facteur comme un élément également incontournable de la réponse cellulaire au stress UV.

Chapitre 3 Régulation des systèmes de protection par les facteurs de transcription, rôle central des protéines p53 et USF1

1. Régulation de la disponibilité de la protéine p53 en réponse au stress UV, un enjeu capital dans la prévention de l'instabilité génomique

La découverte de la protéine p53 par Lane, Crawford, Linzer et Levine en 1979, a marqué un tournant important en biologie. Dans cette discipline p53 s'illustre comme un des moyens les plus importants de protection cellulaire contre l'instabilité génomique initiée par le stress environnemental, dont l'exposition UV solaire.

1.1. La découverte de p53

De façon anecdotique, l'identification de l'interaction de la protéine p53 avec la protéine large T du virus oncogène SV40 à longterm laisser penser que p53 était un oncogène cellulaire ou virale mobilisé par le virus SV40 pour promouvoir la transformation cellulaire [368–370]. Il a fallu plus de dix ans pour découvrir que la protéine p53 était en fait un gène suppresseur de tumeur. Cette qualification s'est faite après avoir observé que la protéine p53 était mutée ou neutralisée dans les cellules transformées par les virus et que c'était en fait sa perte de fonction qui entraînait la transformation cellulaire [371–373]. A cette même période, le stress UV a été découvert comme l'un des premiers agents physiques capables de moduler post-traductionnellement la quantité de p53 intracellulaire et la prolifération. Cela a permis de relier particulièrement les dommages à l'ADN, le cycle cellulaire et l'instabilité génomique à la disponibilité de la protéine p53 [373,374].

Le concept de « policier » ou « gardien du génome » capital dans la prévention de la carcinogenèse est vraiment né en 1992 [375]. Cela a été possible après plusieurs constats dont : i) l'identification de plusieurs mutations sur les deux allèles de *TP53* dans les tumeurs murines et de nombreuses lignées et tumeurs humaines [376], ii) l'association de mutations ponctuelles de *TP53* dans 75% des cancers colorectaux humains [376] et iii) les mutations germinales sur un allèle de *TP53* dans le syndrome de Li-Frauméní qui prédisposent chez l'Homme à de nombreux néoplasmes dont les mélanomes avant l'âge 30 ans [377]. Enfin, le développement d'anticorps ciblant différentes formes de p53 a permis d'identifier la protéine mutée dans 50% des cancers humains [378] et de valider ce concept dans les premières souris *TP53* KO [379].

La qualification de *TP53* comme un gène suppresseur de tumeur s'est suivie de la mise en évidence de son rôle comme facteur de transcription [380,381]. Dans ce contexte, il a été identifié que la protéine MDM2 régulait négativement la stabilité et l'activité de p53 et quand même temps le gène *MDM2* était une cible transcriptionnelle de p53 [382–385]. La mise en évidence de cette boucle de régulation a permis définitivement de caractériser la protéine p53 comme un véritable senseur

de la réponse cellulaire au stress environnementale. Depuis, les mécanismes régulant la disponibilité de p53 se sont énormément complexifiés par l'identification : de différentes isoformes de p53 [281], d'homologues tissus spécifiques de p53 comme p63 [386,387] et p73 [388] ou d'homologue de MDM2 comme MDMX/4 [389,390]. La liste s'étend plus récemment avec l'implication d'autres facteurs de transcription comme : YY1 [391], ATF3 [392] et le co-activateur p18^{Hamlet} [279,393] dans la réponse aux agents endommageant l'ADN. Aujourd'hui encore, d'autres entités biologiques, comme les protéines RASSF [394], ont également été impliquées dans la régulation fine de la disponibilité de la protéine p53 et l'orientation du comportement cellulaire en réponse au stress UV.

Dans ce sens, plusieurs questions subsistent encore, particulièrement dans la réponse à l'exposition UV et notamment quels sont les partenaires généraux ou spécifiques de p53 qui permettent de différencier finement le programme cellulaire dicté par la protéine p53 ?

Dans la partie suivante, nous verrons dans un premier temps l'importance de la régulation de p53 en réponse à l'exposition UV, puis comment la disponibilité de cette protéine est régulée au niveau basal et en réponse à l'exposition UV.

1.2. Un suppresseur de tumeur central dans la protection contre les effets délétères des UV

Comme exposé dans les parties précédentes, et synthétisé dans la Figure 18, la protéine p53 est un carrefour central de la réponse cellulaire à l'exposition UV. Cette protection est assurée par un programme transcriptionnelle complexe dans lequel la protéine p53 régule des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la pigmentation et assure ainsi une réponse immédiate mais également adaptative à l'exposition UV [107,395,396] (**Figure18**).

La quantité de protéine p53, qui varie immédiatement en réponse à l'exposition UV, influence différenciellement le choix entre l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Ainsi, *in vivo* et *in vitro*, la protéine p53 est présente à un niveau difficilement détectable dans les cellules cutanées non lésées. En réponse aux UV, la quantité de p53 est rapidement augmentée à un niveau qui est corrélé au degré de dommages cellulaires [152,153,239,287,288,373,374,385,397,398]. Dans ce contexte, une faible quantité de protéine p53 favorise l'arrêt transitoire du cycle cellulaire pour donner un temps suffisant à la réparation de l'ADN à l'issue de laquelle la quantité de p53 décroît rapidement. A la différence, si la réparation de l'ADN est retardée, un niveau élevé et soutenu de p53 entraîne le plus souvent l'apoptose [155–157,159,197,209,214,383,399–401]. L'adaptation à l'exposition UV comprend l'activation de la pigmentation cutanée. Si la protéine p53 a été impliquée dans ce mécanisme, aucune donnée ne renseigne sur le niveau de dommage cellulaire et la quantité limite de p53 à atteindre pour induire la pigmentation. Néanmoins, dans les kératinocytes murins *in vivo*, un niveau élevé et soutenu de protéine p53 semble important pour l'expression de la protéine POMC, le précurseur de l' α -MSH (Chap.2, sect.3.3) [366,367].

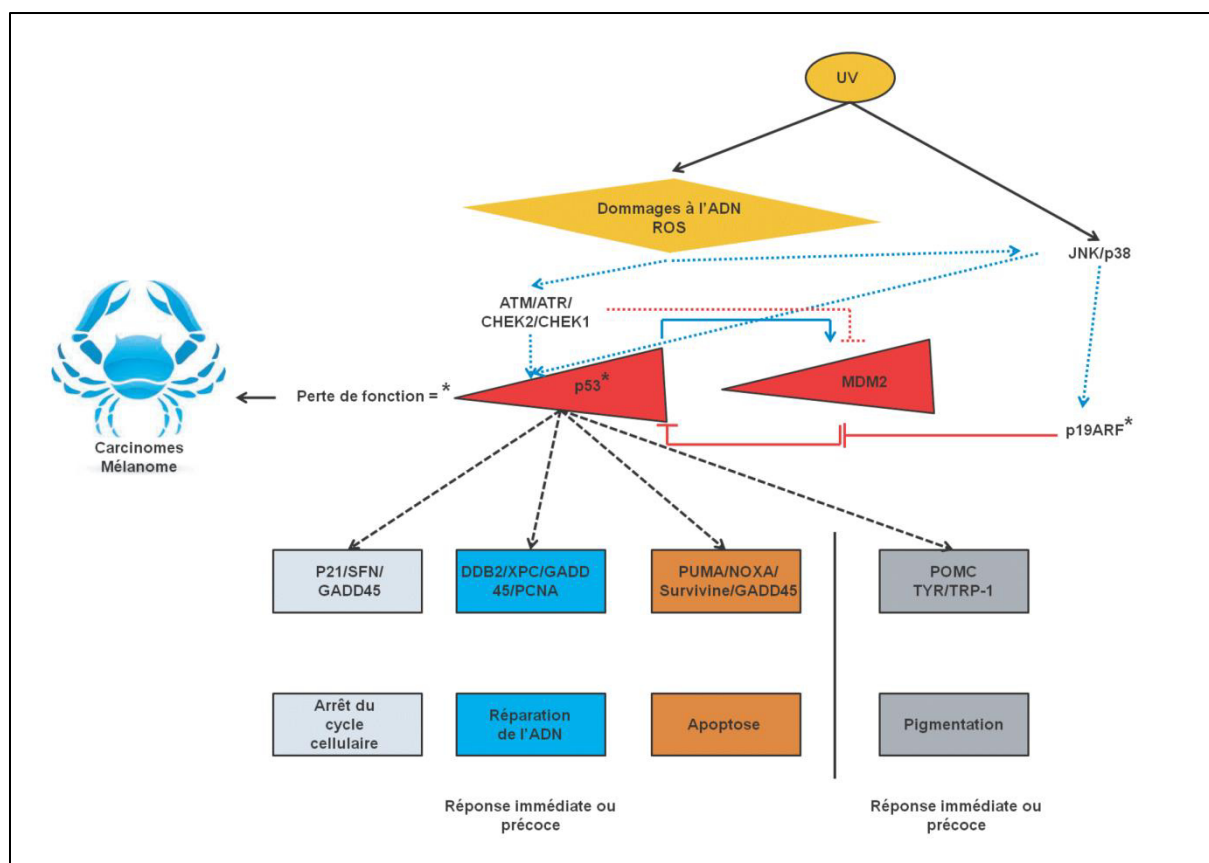


Figure 18 : Rôle pléiotropique de la protéine p53 dans la réponse à l'exposition UV.

La protéine p53 est un carrefour central de la réponse à l'exposition UV. Par son activité transcriptionnelle adaptée à l'intensité du stress, elle permet de moduler le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la pigmentation dans les cellules cutanées. Sa déficience, ou celle d'un de ses régulateurs (*) peuvent altérer la réponse aux UV et être responsables d'une instabilité génomique qui peut mener à la genèse de carcinomes et de mélanomes. (Schéma construit personnellement à partir des références du corpus).

L'importance de la régulation de p53 dans la réponse à l'exposition UV est également soulignée par l'implication de la perte de fonction de la protéine dans la genèse de différents cancers cutanés humains (**Figure 18 et Tableau I**). Ainsi, les carcinomes cutanés arborent dans 50 à 90% des cas des mutations du gène *TP53* [72,78,112–117,142]. A l'instar de ces données, l'analyse de modèles murins ayant perdus la fonction de la protéine p53 montre également un développement précoce de carcinomes cutanés après une exposition UV répétée [63]. Moins fréquentes, les mutations de *TP53* sont observées dans 5 à 10% des mélanomes et sont fortement impliquées dans la progression tumorale et l'agressivité de ce cancer [48,84,130,402]. Comme les carcinomes, chez la souris, la perte d'expression de p53 ou de sa fonction accélère la formation de mélanomes cutanés en réponse aux UV [64,125,129]. Enfin, plusieurs données suggèrent que les conséquences de la perte de fonction de la protéine p53 dans le mélanome pourraient être sous-estimées. Si les mutations du gène *TP53* concourant à la perte de fonction de la protéine p53 de façon directe sont rares [48,84,130,402], d'autres gènes, plus fréquemment mutés, peuvent également affecter indirectement l'activité de la protéine p53. Ainsi, les mutations du gène de susceptibilité au mélanome *CDKN2A* qui affectent la fonction de la protéine p14^{ARF} (p19^{ARF} chez la souris), altèrent également la fonction de la protéine p53 [48,84,124]. Dans ce contexte, comme l'inactivation de p53 dans les modèles animaux exposés aux UV, la perte de fonction de la protéine p19^{ARF} altère l'activité de p53 et favorise l'induction de mélanomes cutanés [65,66,131].

1.3. Mécanisme de régulation de la disponibilité cellulaire en protéine p53

1.3.1. La famille p53

La protéine p53 est un facteur de transcription [380,381] exprimé de manière ubiquitaire et traduit sous la forme d'une phosphoprotéine nucléaire conservée de la drosophile à l'Homme. Cette dernière appartient à une famille qui compte trois membres avec p63 et p73 avec lesquels elle partage une forte homologie de séquence et de structure [281].

Nous ne développerons pas ici exhaustivement les fonctions des protéines p63 et p73. Néanmoins, il est à retenir que comme p53, plusieurs isoformes de ces protéines existent [281]. De plus, certaines isoformes de p63, associées au développement épithélial, sont particulièrement exprimées par les cellules basales de l'épiderme où elles jouent un rôle crucial dans la prolifération et la différenciation de l'épiderme [386,387]. L'isoforme Δ Np63 α , dont nous avons parlé dans la partie dédiée à l'apoptose (Chap.2, sect.2.4.) est un dominant négatif de la protéine p53 qui est important pour le maintien du caractère indifférencié et prolifératif des cellules souches basales. Cette isoforme est dégradée en réponse aux UV ce qui favorise les effets apoptotiques de p53 [282–284,403]. D'autres isoformes comme TAp63 γ exercent des fonctions de protection contre l'instabilité génomique en modulant de façon directe l'expression de certains gènes cibles de p53. Comme p53, le niveau protéique de TAp63 γ augmente en réponse aux UV et TAp63 γ se fixe aux séquences consensus des gènes cibles de p53 pour favoriser la réparation de l'ADN

et la survie cellulaire [404]. Enfin, à la différence de p63, la fonction de p73 est vraisemblablement plus restreinte au développement du tissu nerveux [388].

1.3.2. Les protéines codées par *TP53*

Le gène *TP53* (**Figure 19A**) est localisé sur le chromosome 17p13 [370,376], ce dernier est contrôlé par trois promoteurs dont deux promoteurs alternatifs P1 et P1' sur l'exon 1 et un promoteur interne, P2, dans l'intron 4. L'épissage alternatif (intron 2 ou 9) des ARN pré-messagers correspondants permet de générer neuf isoformes protéiques (**Figure 19B**) qui se distinguent par une réduction de la taille des parties N-terminale et/ou C-terminale. La protéine de pleine longueur est p53 α alors que les formes réduites sont : p53 β , p53 γ , Δ 133p53, Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ , Δ 40p53, Δ 40p53 β et Δ 40p53 γ [281,405].

1.3.2.1. L'isoforme p53 α

p53 α est l'isoforme codée par le gène *TP53* la plus connue. Elle est l'isoforme la plus longue qui est exprimée de façon ubiquitaire et qui compte 393 acides aminés [281]. Au niveau fonctionnel, la protéine p53 comporte trois domaines principaux (**Figure 19B et C**). Le premier correspond à un domaine de transactivation en N-terminal (résidus 1-83) qui comprend une région riche en proline (résidus 61-94). Dans la littérature celui-ci est parfois subdivisé en deux sous domaines (TAD1 et TAD2). Le deuxième domaine, au niveau central, est un domaine de liaison à l'ADN (DBD) (résidus 102-292). Enfin, le troisième domaine correspond au domaine d'oligomérisation en C-terminal (TET) (résidus 324-355) qui est couplé à une région basique (résidus 363-393). Il est à noter que le domaine d'oligomérisation est encadré de part et d'autre par des séquences de localisation nucléaire et d'export nucléaire (NLS et NES) [281,406-411].

- Le domaine portant l'activité transactivatrice

Le domaine N-terminale de p53 est impliqué dans l'activité transactivatrice de p53, celui-ci peut interagir avec la machinerie de transcription par l'intermédiaire des protéines TAFs (TBP associated factors) du complexe de transcription TFIID [412]. Le domaine N-terminale est également la cible d'autres interactions protéine-protéine, avec notamment le co-activateur CBP/p300 ou l'ubiquitine ligase MDM2, qui sont importantes pour la régulation de la stabilité et l'activité transcriptionnelle de p53 [383,411,413-415]. Enfin, le domaine N-terminale contient un nombre particulièrement important de sites de phosphorylation qui vont également influencer la disponibilité et l'activité de p53 en réponse au stress UV [416,417].

- Le domaine de liaison à l'ADN

Le domaine central sert à la liaison de p53 sur des séquences d'ADN en tandem de type: 5'-PuPuPuC(A/T)-(T/A)GPyPyPy-3' (P53RE) [380,381]. C'est dans cette région que presque 90% des mutations impliquées dans les cancers humain ont été

retrouvées [51,376,418–420]. Cette région peut être également engagée dans des interactions protéiques qui vont moduler la fixation de p53 à ses séquences cibles. A titre d'exemple, la fixation de l'antigène T du SV40 à cette région inhibe la liaison de p53 à l'ADN et favorise la transformation cellulaire [108,373].

- Le domaine d'oligomérisation

Le domaine d'oligomérisation sert à la formation de dimères ou de tétramères de la protéine. Il a été cependant montré que le tétramère constitue la conformation qui a le plus d'affinité et qui se fixe de façon la plus stable aux séquences consensus cibles de p53 [421]. Les séquences de localisation nucléaire et d'export nucléaire vont permettre le transport bidirectionnel de p53 entre le cytoplasme et le noyau [281,406–411]. Enfin, la région basique constitue une région propice aux modifications post-traductionnelles, notamment l'ubiquitination et l'acétylation qui sont importantes pour réguler la stabilité de p53 [138].

1.3.2.2. Les autres isoformes de p53

En dehors de p53 α , les autres isoformes de p53 ont également un rôle important car elles peuvent agir sur l'activité de p53 α en tant que dominant négatif ou transactivateur selon la présence ou non des différents domaines fonctionnels (**Figure 19B**). Ces effets peuvent être médiés par interaction « protéine-protéine » avec p53 ou après fixation directe sur ses séquences consensus au niveau de l'ADN [281]. A notre connaissance, aucune donnée en rapport avec le stress UV n'étaye à ce jour les fonctions des isoformes de p53. Néanmoins, ces isoformes semblent tissus spécifiques et certaines comme p53 β ou Δ 133p53 sont respectivement des activateurs et inhibiteurs de l'activité transactivatrice de p53 en réponse au stress chimique dont l'actinomycine D [405]. D'autre part, il est à noter que l'expression de certaines isoformes peut être modulée en réponse au stress biologique. Il a ainsi été montré que l'infection par *Helicobacter Pylori*, une bactérie impliquée dans les cancers gastro-intestinaux, entraîne l'induction de l'expression de l'isoforme Δ 133p53. Dans les cellules épithéliales gastriques, cette isoforme agit comme un dominant négatif de p53 qui favorise l'instabilité génomique promue par l'infection bactérienne [422–424].

1.3.3. La régulation basal et UV induite de l'ARNm *TP53*

La stabilisation de la protéine p53 en réponse au stress UV implique majoritairement des mécanismes de régulation post-traductionnelle. Si l'expression du transcrit *TP53* est une condition *sine qua non* à la production et la stabilisation de la protéine p53, aucun consensus n'existe sur le ou les facteurs de transcription nécessaire(s) de façon ubiquitaire pour l'expression du transcrit *TP53*. Ainsi, les données disponibles sur la régulation du promoteur *TP53* sont largement tirées de l'analyse de modèles pathologiques (lignées cellulaires et tumeurs diverses). Pour autant, plusieurs données suggèrent que l'expression basale du transcrit *TP53*, qui peut varier en

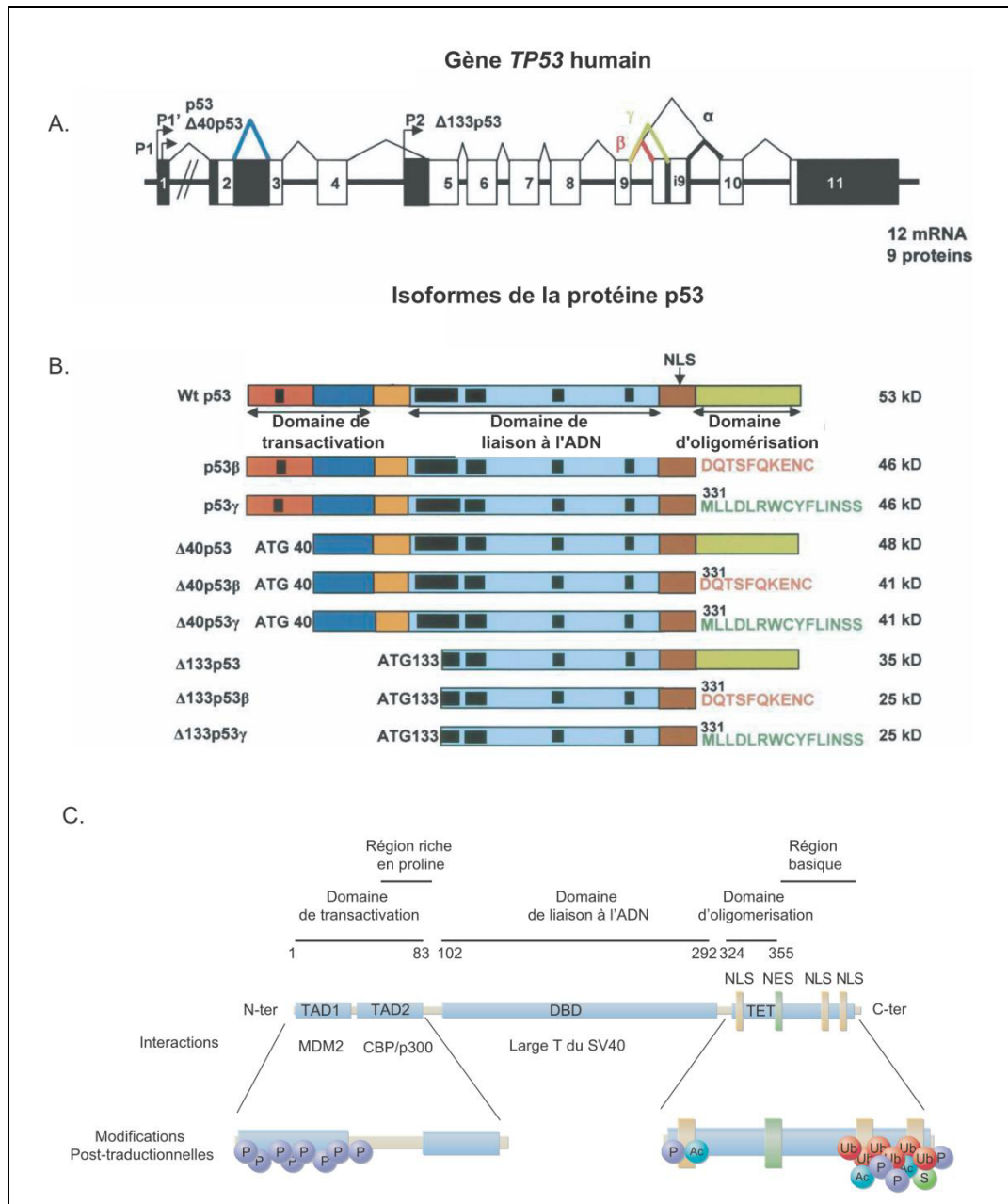


Figure 19 : Structure du gène et de la protéine p53.

A. Le gène *TP53* est régulé par trois promoteurs, le promoteur P1 permet de générer l'isoforme p53 la plus longue (53kDa, Fl-393) qui est également la plus connue et étudiée. Les promoteurs P1' et P2 permettent de produire les autres isoformes. Au total, 9 isoformes, selon l'épissage alternatif peuvent être générées à partir du gène *TP53*. B. Représentation des différentes isoformes de la protéine p53 qui se distinguent par des variations en N-terminale et/ou en C-terminale. C. Structure et domaines fonctionnels de l'isoforme de p53 la plus étudiée avec les sites majeurs de modifications post-traductionnelles intervenant dans la régulation de la disponibilité et l'activité de la protéine. (A et B sont des illustrations tirées et adaptées à partir de réf. [281,425] et C de [425]).

fonction du type cellulaire et de son stade de différenciation, influence la réponse aux agents endommageant l'ADN dont les UV. De plus si la variation de l'ARNm *TP53* total au niveau de la peau exposée aux UV constitue un événement mineur, de rares données indiquent la présence de séquences de régulation répondant à l'exposition UV dans le promoteur de *TP53*.

1.3.3.1. Variations de l'expression du transcrit *TP53*, impacts sur la réponse aux dommages à l'ADN

Durant le développement murin, l'analyse par hybridation *in situ* de l'ARNm *TP53* révèle une expression dans toutes les cellules jusqu'à E10.5. A partir de l'organogenèse (E12.5-E18.5), l'expression de *TP53* décline et devient beaucoup plus hétérogène. Une forte expression est maintenue dans plusieurs tissus dont: le cerveau, le foie, les poumons, le thymus, l'intestin, les glandes salivaires, et les reins [426]. Chez la souris adulte, hormis : la rate, le thymus et l'intestin qui présentent des niveaux élevés d'ARNm *TP53*, cette quantité est faible et varie peu dans les autres tissus. Ces variations concernent les cellules souches et les cellules proliférantes qui présentent globalement des niveaux d'ARNm *TP53* plus forts que les cellules différenciées [427]. La peau est un bon exemple de cette dichotomie, aussi, les cellules basales murines et humaines expriment un niveau d'ARNm *TP53* plus important que les cellules différenciées des couches supérieures de l'épiderme [401,428-430] (**Figure 20A**).

La raison de ces variations de la quantité de transcrit *TP53* est discutée, elle dépendrait vraisemblablement de la rareté et du potentiel prolifératif des cellules considérées. Des données tirées de l'analyse des modèles murins exposés aux radiations gamma suggèrent qu'un niveau élevé d'ARNm *TP53* serait nécessaire à la protection des systèmes cellulaires les plus sensibles. Ainsi, un niveau élevé d'ARNm *TP53* dans les cellules rares et/ou cyclant fréquemment, favoriserait une disponibilité rapide et massive en protéine p53. Dans les cellules souches et cellules proliférantes adultes, cela augmenterait la sensibilité à l'apoptose de ces systèmes cellulaires propices à la transformation. Ce concept semble également intéresser le tissu cutané exposé aux radiations gamma [431].

Néanmoins dans les cellules cutanées humaines exposées aux UV, rayons beaucoup moins endommageant que les radiations gamma, ce principe est vraisemblablement différent. Il a été montré qu'au sein de ce tissu, la réponse apoptotique médiée par les UV, UVB particulièrement, fait intervenir majoritairement les cellules différenciées "vivantes" (couche spinieuse et granuleuses). A l'inverse, les cellules basales sont relativement résistantes à l'apoptose. Ces dernières seraient engagées plus facilement dans un processus d'arrêt du cycle cellulaire et d'activation de la réparation de l'ADN qui permet de maintenir l'intégrité du tissu [401,428,429]. Cette hypothèse peut permettre de comprendre que les cellules basales du fait de leur résistance à l'apoptose puissent ainsi accumuler des mutations à long terme.

Enfin, il est à noter que cette conception de sensibilité ou de résistance à l'apoptose selon le statut p53 est parfois contradictoire. Aussi, il a été montré que les cellules issues de patients Li-Frauméni sont hyper-résistantes à l'apoptose induite par les UV du fait de leur inhabilité à bloquer la progression dans le cycle [239,432]. De même

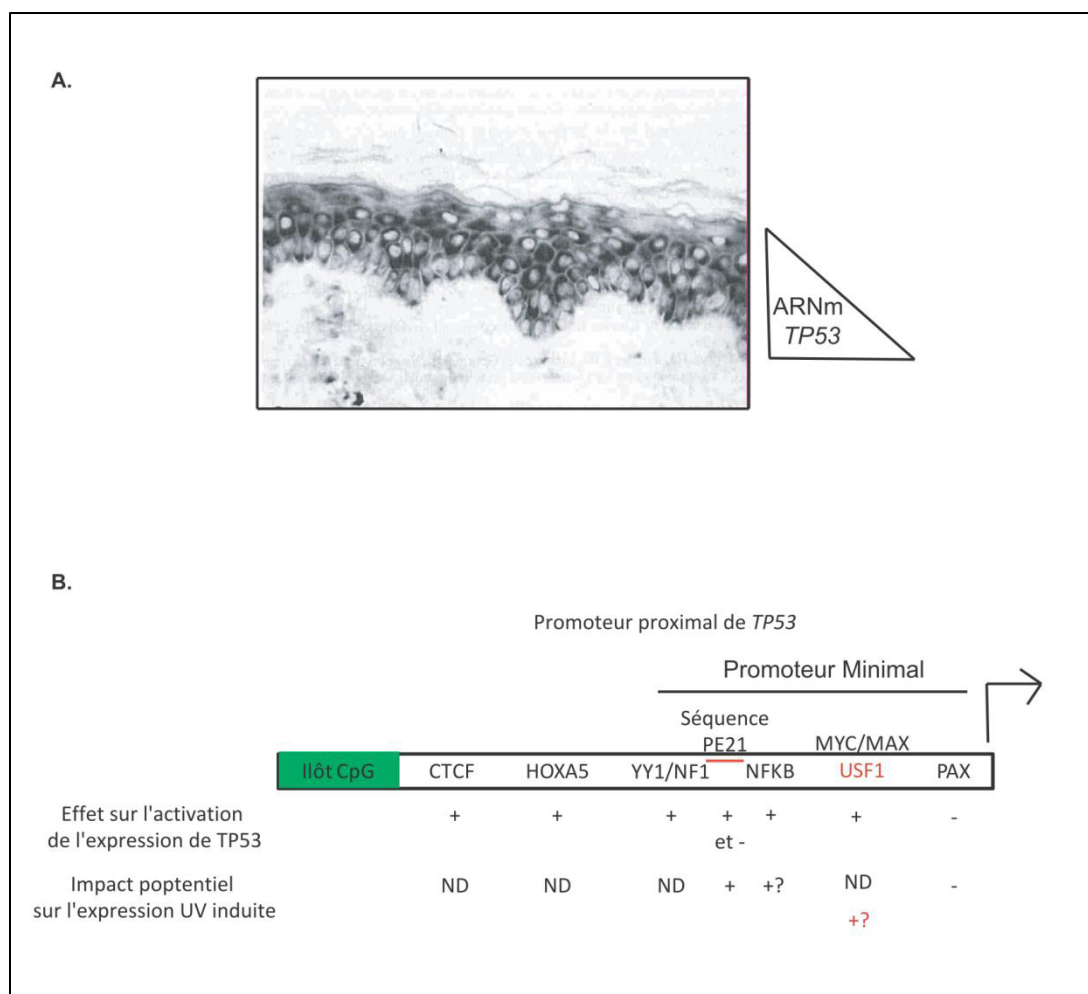


Figure 20 : Régulation transcriptionnelle du gène *TP53*

A. Expression du transcrit *TP53* dans le tissu cutané humain normal observé par hybridation *in situ* sur coupe histologique. B. Représentation du promoteur proximal du gène *TP53* et des facteurs de transcription qui ont été associés à sa régulation. Les sites conservés entre l'homme et la souris ont été représentés. L'espacement entre les différents facteurs ne prend pas en compte l'échelle réelle entre leurs sites de fixation. (A et B ont été tirées et adaptées de respectivement réf. [429,433]).

certaines études affirment que dans les souris invalidées pour p53 exposées au UV l'apoptose est inhibée [^{113,249,434}] alors que d'autres affirment le contraire [^{435,436}].

Collectivement, l'ensemble de ces informations suggère que la quantité basale de d'ARNm *TP53* peut être variable. Cette variabilité peut vraisemblablement influencer la réponse aux dommages à l'ADN selon le type cellulaire et son niveau de prolifération et orienter différemment le comportement cellulaire.

1.3.3.2. Régulation du promoteur de *TP53*

Le promoteur de *TP53* est très conservé entre l'homme, le rat et la souris (**Figure 20B**) et met en évidence des séquences consensus communes pour 9 facteurs de transcription dont : Myc/max, USF1, NFκB, HOXA5, YY1, NF1, Pax et CTCF. Une dernière séquence consensus, nommée PE21, apparaît également importante pour la régulation du promoteur mais le ou les facteurs de transcriptions associés ne sont pas clairement définis. Les séquences de fixation de ces facteurs de transcription s'étendent sur approximativement -683 et -950 bases en considérant les promoteurs humain et murin respectivement [^{433,437}]. Si les démonstrations de la fixation de ces facteurs sur le promoteur *TP53* ont souvent été réalisées *in vitro*, l'impact de leurs invalidations vient à manquer dans les modèles *in vivo*. Il est par conséquent encore difficile d'évaluer le poids de chacun de ces facteurs sur l'expression transcriptionnelle de *TP53* dans les tissus et particulièrement la peau.

- Fixation de facteurs liés au stress UV sur le promoteur *TP53*

La régulation du promoteur *TP53* peut faire intervenir la fixation du facteur de transcription NFκB. Il a été montré que le NFκB activé en réponse au TNFα était capable de se fixer et d'activer le promoteur *TP53* dans les cellules Hela [⁴³⁸]. De façon intéressante le NFκB pourrait influencer de cette façon la sensibilité des cellules cutanées aux UV dans la mesure où le TNFα responsable de son activation est une cytokine rapidement exprimée après l'exposition UV dans la peau [⁴³⁹]. En lien avec cette observation mais cependant dans des modèles différents, il a été montré que le prétraitement par le TNFα de lignées cellulaires proficientes pour p53 permettait de diminuer la sensibilité à l'apoptose médiée par les UV, alors que le même traitement dans des cellules déficientes pour p53 augmente la sensibilité à l'apoptose [⁴⁴⁰]. Ces derniers résultats n'ont pas été reproduits dans des modèles cutanés mais suggèrent une importante contribution du facteur de transcription NFκB dans la régulation de *TP53* et de ses fonctions apoptotiques dans les conditions inflammatoires.

Egalement en lien avec les UV, il a été montré qu'une séquence consensus, nommée PE21, proche du site de fixation du facteur de transcription NFκB pouvait être importante pour la régulation basale et UV (UVC) induite du promoteur *TP53* humain. Cette séquence de 21pb et située à 80 bases en amont du TSS (transcription start site) serait minimalement requise pour réguler l'expression du gène *TP53* [^{437,441,442}]. La séquence PE21 pourrait accueillir de façon constitutive une ou plusieurs protéines qui n'ont pas été clairement identifiées. Fixées sur le promoteur, l'activité de ces dernières pourrait être modulée par l'exposition UV [⁴⁴¹]. La séquence PE21 semble relativement importante puisqu'elle a également été impliquée dans l'expression de l'ARNm et de la protéine p53 en réponse aux

traitements par des agents chimiothérapeutiques (Docetaxel et 5FU) dans des lignées de carcinome pulmonaire [443]. Dans cette étude, le/les facteur(s) de transcription en cause dans la régulation du promoteur ne sont également pas définis.

Enfin, la séquence PE21 ne servirait pas qu'à activer, elle pourrait également avoir un effet répresseur sur l'expression transcriptionnelle de *TP53*. Ceux-ci a pu être mis en évidence dans des lignées de carcinome mammaire avec cette fois la fixation du facteur KLF4 [442]. A la différence de l'étude impliquant la réponse UV induite de la séquence PE21, la fixation de KLF4 sur le promoteur de *TP53* pourrait être modulée par une augmentation de l'expression de la mucine 1 (MUC-1). MUC-1 est une glycoprotéine membranaire et cytosolique, fréquemment observée dans les lignées de carcinomes mammaires. MUC-1 en interagissant physiquement avec KLF4 sur l'ADN potentialiserait la répression de l'expression de l'ARNm *TP53* [442].

Concernant, le facteur de transcription ubiquitaire USF1, bien que sa fixation sur les promoteurs humain et murin de *TP53* ait été validée [444,445], la relevance physiologique de cette fixation manque. Pourtant USF1 est situé dans la région minimalement requise pour l'expression du transcrit *TP53* [437]. De plus, comme nous le verrons dans la dernière partie de ce manuscrit, USF1 est un facteur de transcription ubiquitaire [358,359] dont l'activité transcriptionnelle est étroitement associée à la réponse au stress UV [186,187,226,360].

- Fixation de facteurs indépendamment du stress UV sur le promoteur *TP53*

De façon indépendante des UV, les études sur le promoteur *TP53* montrent que les facteurs de transcription NF1 et YY1 pourraient être importants pour l'expression tissu spécifique de l'ARNm *TP53*. Chez le rat, il a été montré que NF1 et YY1 sont capables de se fixer à un site composite du promoteur. La fixation des deux facteurs est différentielle selon le tissu et ferait intervenir la fixation de NF1 sur le promoteur de *TP53* dans les testicules et la rate alors qu'YY1 est associé au promoteur *TP53* dans le foie et la prostate. Dans les cellules Hela, les auteurs montrent également le caractère mutuellement exclusif de la fixation de ces deux facteurs de transcription sur le promoteur *TP53* [446].

Dans plusieurs modèles cellulaires de cancer. Il a été observé que la fixation des facteurs de transcription c-Myc et Max, HOXA5, et PAX5 peut avoir un impact majeur dans la régulation basale du transcrit *TP53*.

Les facteurs de transcriptions c-Myc et Max sont capables de se fixer au promoteur de *TP53* et de l'activer [447,448]. De façon intéressante, il a été observé une corrélation entre le niveau de protéine c-Myc et l'ARNm *TP53* dans des lignées de glioblastome et de lymphome de Burkitt exprimant des protéines p53 mutées [448]. Dans ce cas l'intervention de l'oncogène c-Myc pourrait participer à l'augmentation d'expression de la protéine p53 mutante et potentiellement participer à l'agressivité de ces cellules.

La fixation du facteur de transcription HOXA5 sur le promoteur *TP53* quand à elle a été impliquée dans les carcinomes mammaires. Dans ces tumeurs le niveau faible de la protéine p53 peut être dû à la méthylation du gène *HOXA5*. Les auteurs mettent en évidence que HOXA5 en se fixant sur le promoteur *TP53* induit l'augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine correspondante. Ils montrent également que

l'irradiation gamma comme la surexpression de HOXA5 dans les cellules épithéliales de carcinome mammaire induit une apoptose dépendante de p53 [⁴⁴⁹].

L'importance de la régulation transcriptionnelle de *TP53* par la protéine PAX5 a pu être mise en évidence dans l'analyse de culture primaire d'astrocytome. Dans ces cellules, le niveau élevé de protéine p53 mutée a été corrélé à une perte d'expression de PAX5. Dans ce modèle, PAX5 en se fixant au promoteur *TP53* réprimerait son expression et son activité. Ce système pourrait également expliquer le maintien du phénotype prolifératif durant le développement embryonnaire [⁴⁵⁰].

L'association du facteur de transcription CTCF au promoteur *TP53* humain et murin constitue un élément important pour maintenir la configuration ouverte de la chromatine dans le gène *TP53*. Ainsi, l'absence de fixation de CTCF au promoteur *TP53* dans des lignées de glioblastome a été corrélée avec la perte d'expression de p53 dans ces lignées [⁴⁵¹].

1.3.4. Régulation post-traductionnelle de p53

L'ensemble des domaines de la protéine p53 peuvent être la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles en réponse aux agents endommageant l'ADN (**Figure 19C**). Ces modifications ont été associées à une sorte de code barre qui permet d'ajuster finement l'activité de la protéine en fonction du type de stress et de son intensité [^{417,452}]. En lien avec l'exposition UV, nous nous focaliserons sur les modifications qui concourent à moduler la fixation de p53 à son inhibiteur physiologique majeur, la protéine MDM2. Ces modifications, majoritairement des phosphorylations, acétylations et ubiquitinations assurent la modulation de la stabilité et de l'activité de p53.

1.3.4.1. Maintien du niveau cellulaire minimal de p53 en absence de stress, rôle fondamental de MDM2

En absence de stress, la production de p53 est relativement constante dans les cellules [⁴²⁷]. Cependant la demi-vie de la protéine est très faible (20 à 30 min) de par sa dégradation constitutive par le protéasome 26S [³⁹⁸]. Cette dégradation n'est pas totale, aussi, il a été montré par des études d'occupation des promoteurs des cibles spécifiques de p53 qu'un reliquat protéique pouvait être conservé et probablement même lié à l'ADN [^{453,454}]. Celui-ci serait toutefois maintenu sous une forme latente par une conformation défavorable de la chromatine [⁴⁵⁵] ou son association à des répresseurs comme MDM2 ou MDMX/4 (**Figures 21A et B**) [^{452,456}]. Les modalités exactes d'échappement à la dégradation protéasomale de ce reliquat protéique basal de p53 et sa fixation sur l'ADN ne sont pas encore clairement définies. Aussi p53 semble être contrôlé à l'état basal à deux niveaux, par la régulation de sa disponibilité et par le blocage de l'activité transcriptionnelle du pool résiduel de la protéine. MDM2 est l'ubiquitine ligase de type E3 qui assure majoritairement ces deux types de fonctions [⁴⁵⁶⁻⁴⁵⁸]. Aussi, en présence de stress génotoxique,

particulièrement les UV, l'activation de p53 nécessite une étape incontournable consistant à bloquer l'association de p53 à son inhibiteur physiologique MDM2 (**Figure 18 et 21B**).

1.3.4.2. Importance de l'ubiquitine ligase MDM2 dans le contrôle de p53

MDM2 est une phosphoprotéine de type ubiquitine ligase E3 [^{411,459,460}] (**Figure 21A et B**). L'importance de MDM2 dans le contrôle de p53 a pu clairement être mise en évidence *in vivo*. Ainsi, la perte de MDM2 chez la souris entraîne la mortalité des embryons au stade E7.5 suite à une accumulation massive de p53 et une activation constitutive de la protéine qui engendre un blocage total de la prolifération des cellules embryonnaires. A l'inverse, les souris doublement invalidées pour MDM2 et p53 montrent une restauration complète du phénotype avec des souris viables et capables de se reproduire [³⁸⁹].

La protéine MDM2 n'assure pas uniquement le contrôle de p53 durant le développement, elle est également importante pour assurer cette fonction dans le tissu adulte. Cette analyse a été permise grâce aux souris génétiquement modifiées pour exprimer de façon conditionnelle p53 (sous le contrôle d'un promoteur répondant au tamoxifène) dans un fond invalidé pour MDM2. Chez ces souris, l'induction de p53 par le tamoxifène cause une mortalité des souris dans les 5 à 6 jours après traitement. Ces souris présentent une atrophie des tissus radiosensibles (comme le thymus et les intestins) due à une apoptose massive. Dans les tissus non radio-sensibles (comme le cerveau), une inhibition complète de la prolifération cellulaire est observée [⁴⁶¹].

1.3.4.3. Liaison p53-MDM2 et ubiquitination de p53

Au niveau structural, la partie N-terminale de MDM2 forme une poche hydrophobe dans laquelle se fixent les acides aminés Phe¹⁹, Trp²³, and Leu²⁶ du domaine TAD1 de p53 [⁴¹⁰] (**Figure 19C et 21A**). Cette fixation inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 et entraîne l'ubiquitination et la dégradation de p53 (**Figure 21B**) [^{407,411}]. La protéine MDM2 n'a pas d'activité enzymatique intrinsèque et coopère avec les ubiquitine ligases de type E2 pour pouvoir catalyser le branchement de l'ubiquitine à p53. En absence de stress, il a été montré qu'Ubch5B et Ubch5C pouvaient être des partenaires physiologiques de MDM2 nécessaires à l'ubiquitination de p53 [⁴⁶²] (**Figure 21B**).

Les protéines p53 et MDM2 sont toutes les deux nucléaires mais capables d'être transloquées dans le cytoplasme [^{408,463}]. Dans les conditions normales, il a été montré que l'association et l'ubiquitination de p53 par MDM2 se faisait dans le noyau [^{408,463}]. Les sites d'ubiquitination de p53 résident majoritairement dans sa partie C-terminale (**Figure 19C**) et impliquent les lysines : 370, 372, 381, 382 et 386 [^{407,464}]. D'autres sites d'ubiquitination ont été observés dans le domaine de liaison à l'ADN et pourraient également être critique pour la dégradation de p53 médiée par MDM2

[⁴⁶⁵]. L'ubiquitination de p53 par MDM2 peut consister en des mono-ubiquitinations ou

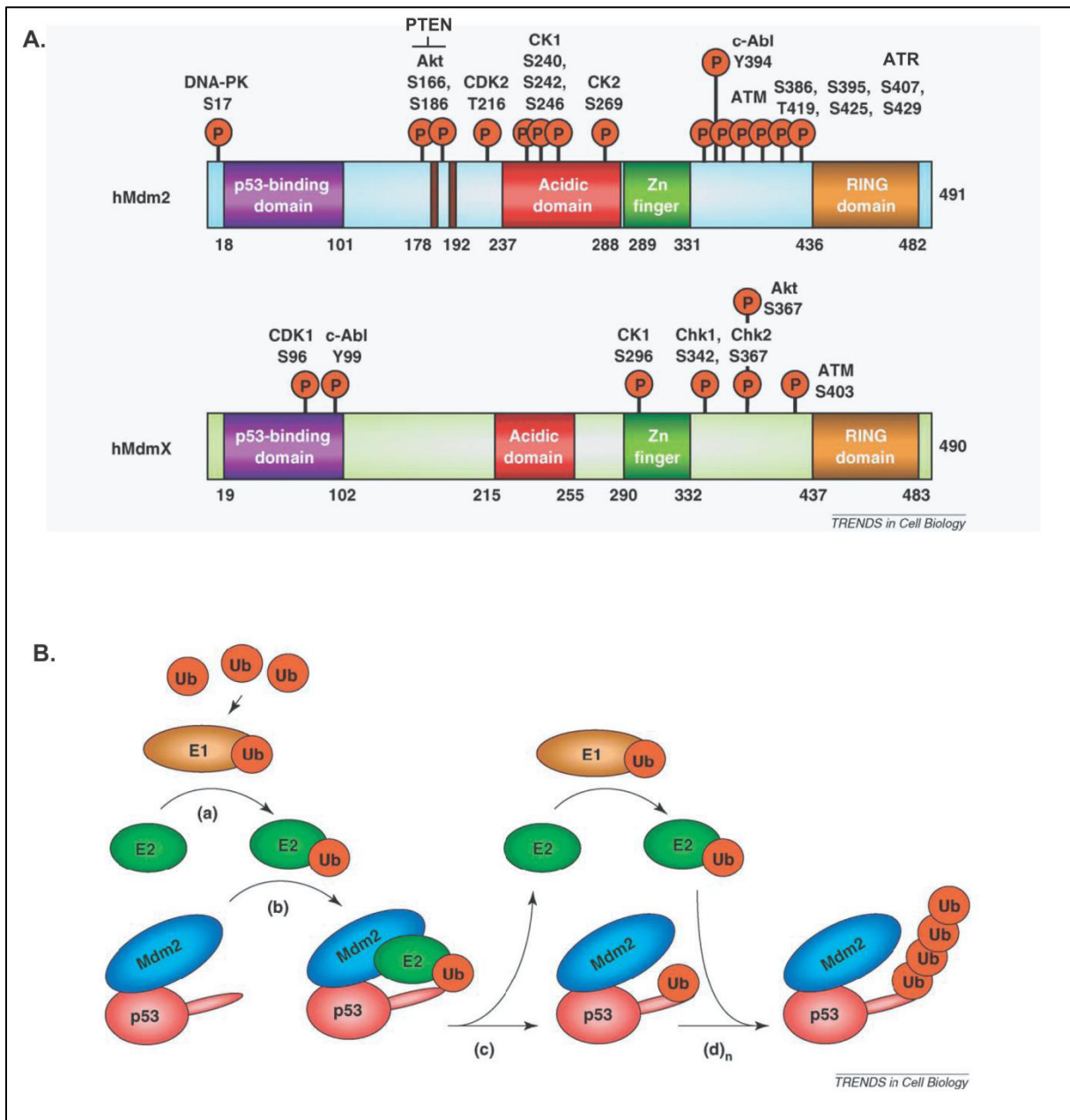


Figure 21 : Structure des protéines MDM2, MDMX et Ubiquitination de p53.

A. Alignement des domaines fonctionnels de MDM2 et MDMX/4 ainsi que les sites de modification post-traductionnelles ciblées par les kinases de stress. B. Mécanisme d'ubiquitination de p53 par MDM2, une ubiquitine ligase E3 capitale dans la régulation de la stabilité de p53. (Schémas tirés et adaptés de réf. [⁴⁵⁹]).

des poly-ubiquitinations selon la quantité de MDM2 et des cofacteurs présents. L'augmentation des quantités cellulaires de MDM2 tend à favoriser la poly-ubiquitination de p53. Fonctionnellement, dans ce modèle, la mono-ubiquitination de p53 pourrait être impliquée dans son export nucléaire et sa dégradation dans le cytoplasme alors que la poly-ubiquitination favoriserait sa dégradation dans le noyau dans lequel se trouve également des protéasomes [^{463,466,467}].

1.3.4.4. Importance de MDMX/4, un homologue de MDM2 non substituable et complémentaire

MDMX est une ubiquitine ligase qui appartient à la même famille que la protéine MDM2 [⁴⁵⁹]. Les deux protéines partagent une forte similitude de séquence et présentent les mêmes domaines fonctionnels (**Figure 21A**). De la même manière que MDM2, l'invalidation de MDMX/4 entraîne une mortalité embryonnaire qui peut être restaurée par l'invalidation de p53 [³⁹⁰]. MDM2 et MDMX/4 sont étroitement liés à la régulation négative de p53, cependant leurs fonctions régulatrices sur p53 ne sont pas substituables. Alors que MDM2 est capable d'inhiber l'activité transactivatrice de p53 et promeut l'ubiquitination de p53, MDMX/4 n'agirait pas de façon directe sur l'ubiquitination de p53 mais sur le blocage de son activité transactivatrice [^{389,390,406}].

Les fonctions de MDM2 et MDMX/4 ne sont pas complètement cloisonnées, aussi MDMX/4 peut être lié physiquement à MDM2. MDM2 et MDMX ont en commun un domaine de fixation à p53 en N-terminale et un domaine RING en C-terminale. Le domaine RING sur les deux ubiquitines ligases permet l'hétérodimérisation des deux protéines [⁴⁶⁴]. Cette association permet de potentialiser l'activité de poly-ubiquitination de MDM2 sur p53 mais également l'auto-ubiquitination de MDM2 [⁴⁶⁷].

1.3.4.5. Inhibition de l'interaction p53-MDM2 en réponse aux UV

L'inhibition de l'interaction p53-MDM2 revêt un intérêt capital dans la réponse à l'exposition UV. Dans ce mécanisme une cascade complexe permet la phospho-acétylation de p53 et son association subséquente à de nombreux co-activateurs. Ces derniers vont respectivement abroger l'interaction de p53 avec MDM2 et favoriser une réponse transcriptionnelle adaptée aux types et degrés de stress génotoxique. D'autre part, l'expression et les modifications post-traductionnelles de MDM2 vont également concourir à la stabilisation de p53.

1.3.4.5.1. Inhibition de l'expression de MDM2 en réponse à l'exposition UV

La protéine MDM2 à l'état basal est exprimée ubiquitairement et de façon indépendante de p53 [⁴⁶⁸]. A la différence, sa régulation par le stress UV est

largement dépendante de p53. Ainsi, il a été montré que p53 induisait l'expression de MDM2 à des doses faibles d'UV tardivement après l'exposition pour assurer un rétrocontrôle sur sa propre disponibilité [³⁸²⁻³⁸⁵], cependant, ce schéma est plus complexe.

En effet, précocement après l'exposition UV, l'expression de MDM2 peut être également inhibée par l'association de p53 avec des corépresseurs comme le récepteur orphelin TR3. Celui-ci en se fixant sur p53 réprime l'activation des séquences consensus pour p53 sur le promoteur du gène *MDM2*. Cela réduit l'expression de MDM2 dépendante de p53 et favorise la stabilisation de p53 [⁴⁶⁹]. En dehors de ce schéma, il a également été montré que l'expression de MDM2 était rapidement et transitoirement réprimée après une forte dose d'UV et ceci de façon indépendante du site consensus de fixation de p53 [⁴⁷⁰]. Bien que le ou les facteurs de transcription impliqués dans cette répression transcriptionnelle ne soient pas encore clairement identifiés, cette diminution initiale d'expression de MDM2 contribuerait de façon importante à la stabilisation de la protéine p53 en réponse aux UV [^{470,471}].

1.3.4.5.2. Influence des phosphorylations de p53 et de MDM2 induites par les kinases de stress

- Phosphorylation de p53

Dans les années 1992, la première modification post-traductionnelle associée à l'augmentation de la quantité et de l'activité de la protéine p53 a été sa phosphorylation en Ser¹⁵ et Ser³⁷ par la protéine DNAPK [^{398,472}]. Sa position dans le domaine de transactivation l'a défini comme un élément clef d'une modification allostérique de p53 qui l'activerait transcriptionnellement. Ce concept a été solidifié par les travaux de Shie et coll. en 1997. Le groupe montre qu'en réponse à différents génotoxiques dont : les radiations gamma, le cisplatine ou les UV, la phosphorylation en sérine 15 est un événement commun. Il démontre également que cette phosphorylation entraîne une modification tridimensionnelle de p53 qui empêche son association à MDM2 et permet son accumulation et son activité [¹⁹⁸]. On sait aujourd'hui que plus de 18 sites de phosphorylation existent sur la protéine p53. Parmi ces sites, les phosphorylations en N-terminal et C-terminal en réponse aux UV incluent les sites : Ser⁶, Ser⁹, Ser¹⁵, Ser²⁰, Ser³³, Ser³⁷, 46, Thr¹⁸ et Thr⁸¹, et/ou Ser³⁸⁹ qui sont les cibles des kinases de stress : ATM, ATR, DNAPK, p38 ou JNK (Chap.2, sect.2.1.) [^{417,452}] (**Figure 19C**).

Malgré l'importance *in vitro* de ces phosphorylations sur la stabilisation de p53, leurs conséquences *in vivo* se sont révélées moins importantes. Ainsi, chez les souris « knock in » (KI) pour la Ser¹⁸ (Ser¹⁵ chez l'homme) ou pour la Ser²³ (Ser²⁰ chez l'homme), aucun phénotype particulier ni de problème majeure de stabilisation et de fonction de p53 n'ont été observé [⁴⁷³⁻⁴⁷⁵]. Des effets partiels sur l'activité transactivatrice de p53 et une apparition légèrement plus précoce de tumeurs cutanées ont été observés dans les souris KI pour la Ser³⁸⁹ [⁴³⁴].

Ces observations ont suggéré une redondance fonctionnelle entre les différents sites de phosphorylation pour la stabilisation et la fonction de p53 en réponse au stress UV. D'autre part, ils ont également permis de proposer les phosphorylations de p53 comme des éléments d'amorces interchangeables pour initier d'autres types de modifications nécessaires au processus de stabilisation et d'activation de p53 en réponse au stress. Ainsi, la phosphorylation est un élément important permettant notamment l'acétylation de p53 en réponse au stress UV.

- phosphorylation de MDM2

Si les mécanismes de phosphorylation de p53 en réponse aux UV sont bien connus, ceux impliquant MDM2 le sont moins.

De manière directe, il a été montré que la kinase ATR activée par les dommages induits par l'exposition UV était capable de phosphoryler MDM2, particulièrement en Ser⁴⁰⁷. Cette phosphorylation prévient la dégradation de p53 en diminuant la liaison de MDM2 au suppresseur de tumeur et son export cytoplasmique [476]. Comme ATR, ATM est également capable de phosphoryler MDM2 et d'inhiber l'association p53-MDM2 mais cela semble très spécifique de l'exposition aux radiations gamma [477].

Indépendamment des voies canoniques ATM/ATR, il a été montré que la caséine kinase 2 (CK2), activable en réponse aux UV, peut également phosphoryler MDM2 en Ser²⁶⁷ et partiellement affecter sa liaison avec p53 [478].

De manière plus indirecte, il a été montré que la voie de survie PI3K-AKT est activée par les UV et induit la phosphorylation stabilisatrice de MDM2 en Ser¹⁶⁶ et Ser¹⁸⁸. Cela aboutit à la dégradation de p53 par l'intermédiaire de l'augmentation de l'interaction p53-MDM2 [479]. De manière intéressante, cette même voie peut être également inhibée par l'augmentation de l'expression et de l'activité de la phosphatase PTEN qui s'exerce en réponse aux UV [480]. Ainsi, l'inhibition de l'activité d'AKT par la phosphatase PTEN aboutit à la diminution de la phosphorylation de MDM2. Cette diminution de phosphorylation de MDM2 réduit la liaison p53-MDM2 et promeut la stabilisation de p53. Il est à noter qu'ici PTEN peut également directement interagir physiquement avec p53 et le protéger de sa liaison avec MDM2 [481,482].

1.3.4.5.3. L'influence de l'acétylation de p53 induite par CBP/p300

Les protéines de la famille CBP/p300 sont des co-activateurs transcriptionnels qui jouent un rôle particulier dans la régulation de l'interaction p53-MDM2 et dans la stabilité de ces deux acteurs. Les protéines CBP/p300 sont des histones acétyl transférases dotées d'une activité ubiquitine ligase intrinsèque. Dans les cellules non

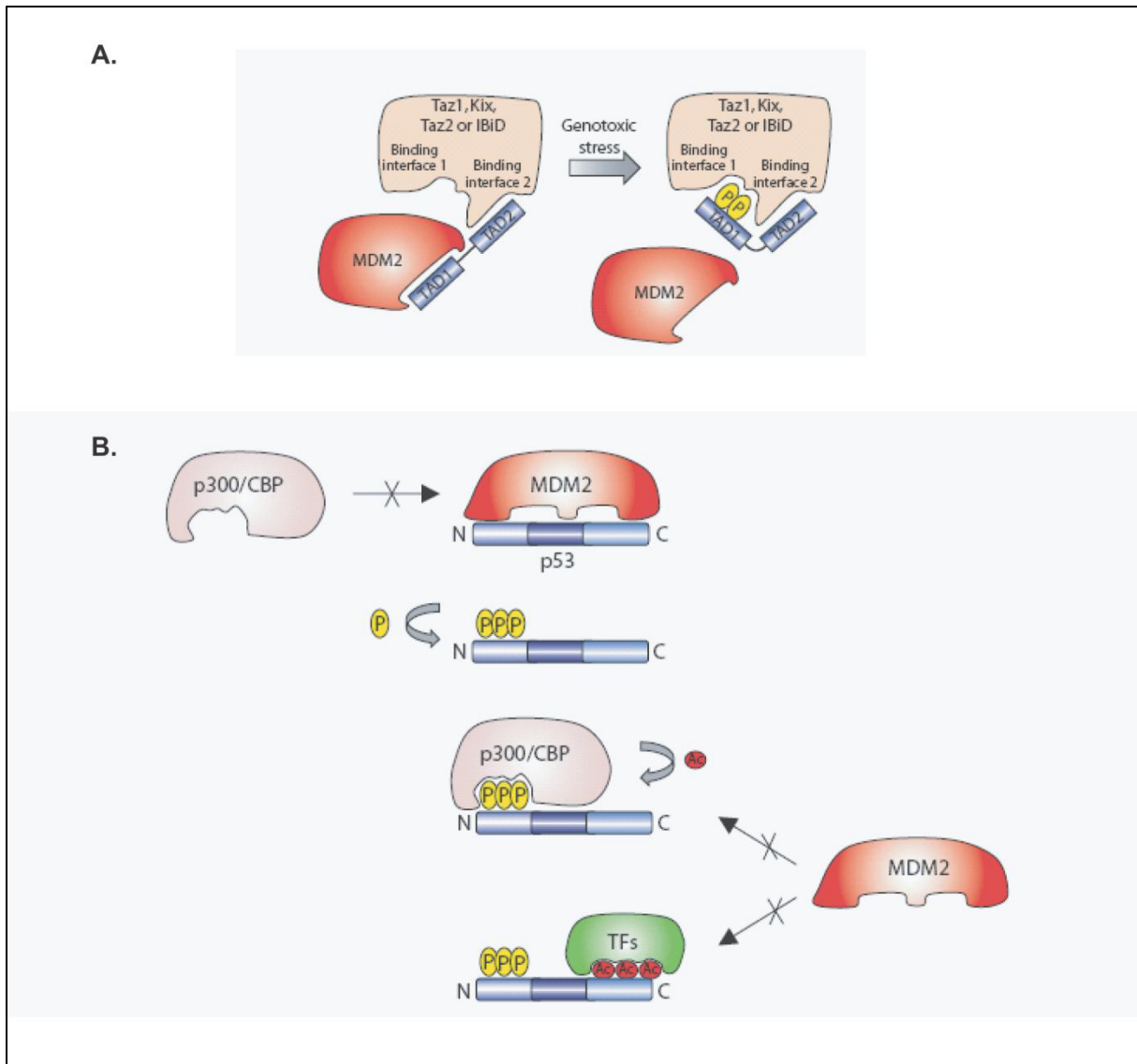


Figure 22 : Mécanisme d'acétylation de p53 par CBP/p300.

A. En absence de stress génotoxique, l'association de CBP/p300 au domaine de transactivation TAD2 de p53 favorise la polyubiquitination de p53 par MDM2 qui est fixé sur le domaine TAD1 de p53. En présence de stress génotoxique comme les UV, la phosphorylation de p53 dans le domaine TAD1 promeut la fixation à celui-ci de CBP/p300. Cela empêche la liaison de MDM2 à ce domaine. B. La fixation de CBP/p300 sur le domaine TAD1 de p53 induit l'acétylation des lysines sur le domaine C-terminal de p53 ce qui contrecarre le branchement d'ubiquitine sur ces mêmes sites par MDM2. (Schémas tirés de la réf. [417]).

stressées, la protéine MDM2 pourrait même être majoritairement liée à CBP/p300 [415,483].

Les protéines CBP/p300 sont capables d'interagir avec le complexe p53-MDM2 et d'initier deux réponses complètement opposées. Ainsi, l'association de CBP/p300 peut stimuler la dégradation de p53 médiée par MDM2 ou au contraire promouvoir la stabilité et l'activité de la protéine p53. Ces deux fonctions opposées sont permises par la formation d'un complexe ternaire (**Figure 22A**) qui lie CBP/p300 au complexe p53-MDM2 [484,485].

En absence de stress, CBP/p300 est lié au domaine TAD2 de p53, il peut alors physiquement interagir avec MDM2 et potentialiser la poly-ubiquitination de p53 et sa dégradation (**Figure 22A et B**). En présence de stress, comme les UV, la phosphorylation des résidus serine et thréonine (Ser¹⁵, Thr¹⁸ et Ser²⁰) dans le domaine TAD1 de p53 augmentent l'affinité de CBP/p300 pour ce domaine. Cela va avoir deux conséquences (**Figure 22A et B**): la dissociation du complexe p53-MDM2 et l'acétylation de p53. Ces deux événements provoquent la stabilisation de p53 et permettent de créer des sites de fixation pour le recrutement de co-activateurs de la transcription sur p53 [417,486]. De façon intéressante, il a été montré que l'acétylation et l'ubiquitination sont deux événements mutuellement exclusifs car leurs sites se confondent dans la partie C-terminale de p53 [484]. Aussi, l'acétylation empêche l'ubiquitination et vice et versa.

Enfin, en ciblant MDM2 il a également été montré que CBP/p300 peut contribuer à l'inhibition de l'activité de MDM2 en l'acétylant directement [487].

1.3.4.5.4. L'interaction de p14^{ARF} avec MDM2

Le produit du gène *CDKN2A*, p14^{ARF} (p19^{ARF} chez la souris) précédemment étayé est associée à la réponse au stress oncogénique mais également au stress génotoxique (Chap.3, sect.1.3.4.5.2.). La protéine p14^{ARF} est localisée dans le nucléole où elle est normalement séquestrée par la nucleophosmine (B23) qui exerce une fonction de chaperonne [76]. Il a été montré que la protéine p14^{ARF} pouvait être relocalisée transitoirement dans le nucléoplasme pour s'associer avec MDM2 en réponse aux UV ou au cisplatine [137]. L'activation de cette voie pourrait faire intervenir les kinases de stress JNK dont l'expression et l'activation sont importantes pour la translocation nucléolaire de p14^{ARF} [488]. Dans le nucléoplasme, p14^{ARF} est capable en réponse au stress génotoxique, dont les UV de séquestrer MDM2. La séquestration de MDM2 bloque son activité ubiquitine ligase à l'encontre de p53 et permet sa stabilisation [138,489].

1.3.4.5.5. L'inhibition du complexe p53-MDM2 par les interactions protéine-protéine, influence particulière des facteurs de transcription

De nombreuses données suggèrent que les facteurs de transcription et les co-activateurs de la transcription sont des éléments importants dans la modulation de la liaison p53-MDM2. De manière importante, l'association de ces facteurs à p53, à MDM2 ou sous forme de complexe ternaire (à la fois à p53 et MDM2) influencerait l'orientation spécifique du programme cellulaire médié par p53.

Dans les informations que nous allons présenter, il est important de noter que les données disponibles sur la modulation de la stabilité de p53 par interférence avec le couple p53-MDM2 n'ont pas été toutes produites en réponse aux UV. D'autres sources d'agents endommageant l'ADN, parfois plus drastiques que les UV, ont souvent été utilisées. Cependant, pour des raisons de compréhension de l'impact de nos travaux nous les utiliserons tout de même avec les nuances qu'elles impliquent.

- Les facteurs de transcription qui favorisent l'interaction p53-MDM2

Les exemples de facteur de transcription qui favorisent l'interaction p53-MDM2 sont peu nombreux dans la littérature. L'exemple le plus représentatif est l'action de YY1 sur la déstabilisation de p53 et l'inhibition de son activité transcriptionnelle.

YY1 est un facteur de transcription multifonctionnel dont nous avons parlé précédemment dans le contrôle basale de l'expression de p53 (Chap.3, sect.1.3.3.2.). Ce facteur de transcription est également impliqué dans la réponse au stress génotoxique. Ainsi, indépendamment de son activité transcriptionnelle, YY1 a été associé à la régulation post-traductionnelle à la fois de p53 et de MDM2. YY1 est régulé post-traductionnellement par clivage protéolytique par des doses apoptotiques d'UV [⁴⁹⁰]. Il apparaît également comme un régulateur négatif de la réponse apoptotique dépendante de p53 en réponse aux agents tels que l'étoposide qui favorise la formation de cassure double brin dans l'ADN [^{391,491}]. *In vitro*, il a été montré que l'expression de YY1 est inversement corrélée à la stabilité de p53. La protéine YY1, en se liant physiquement à p53, altère l'interaction de p53 avec CPB/p300. Cela a pour conséquence de diminuer l'acétylation des lysines de la partie C-terminale de p53 et d'exposer ces mêmes sites à l'ubiquitination par MDM2 [³⁹¹]. YY1 agit également en formant un complexe ternaire avec les protéines p53 et MDM2. De cette façon YY1 favorise l'interaction de MDM2 à p53 et la polyubiquitination et la dégradation du suppresseur de tumeur [⁴⁹¹].

- Les facteurs de transcription qui inhibent l'interaction p53-MDM2

A l'inverse de YY1, d'autres facteurs de transcription ont pour vocation de favoriser l'interaction p53-MDM2 et peuvent ainsi stabiliser la protéine p53. Ce type d'événement est d'ailleurs celui qui est le plus souvent décrit. L'action des facteurs de transcription peut faire intervenir la liaison directe à p53, à MDM2 ou la formation d'un complexe ternaire. La liste de ces facteurs est très importante aussi, nous présenterons les plus importants et ceux qui expliquent les différents mécanismes de stabilisation possible de la protéine p53.

Parmi les facteurs de transcription qui se fixent à p53 pour empêcher son ubiquitination et sa dégradation médiées par MDM2, les facteurs ATF3, 14-3-3 sigma ou DMP1 sont les plus connus. L'expression de ces derniers qui peut être induite par les stress génotoxiques, dont les UV, est souvent corrélée à la stabilisation de p53. Alors qu'ATF3 semble avoir une certaine spécificité pour promouvoir la réponse apoptotique, le facteur 14-3-3 sigma serait lui plutôt engagé dans le contrôle du cycle cellulaire p53 dépendant. Les deux facteurs agissent de la même manière, ils se lient à la partie C-terminale de p53 et masquent les sites d'ubiquitination cibles de MDM2 [211,392,492-494]. De façon singulière, l'action d'ATF3 pourrait être rétro-contrôlée par MDM2 qui est capable de l'ubiquitiner et d'entraîner sa dégradation [495]. Certaines spécificités sont également observées pour 14-3-3 sigma qui est capable par liaison avec MDM2 d'induire l'auto-ubiquitination de la protéine et son export nucléaire [496].

HIF1 α est un facteur de transcription fortement induit en réponse à l'hypoxie [497]. Il a été montré que l'expression de celui-ci était également induite en réponse à l'exposition UV *via* l'activation de la voie de l'EGFR [498]. HIF1 α pourrait être impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose en réponse au stress génotoxique en stabilisant la protéine p53 [498,499]. Il a ainsi été montré, particulièrement en condition hypoxique, que HIF1 α était capable de s'associer à p53 et de prévenir sa liaison et dégradation par MDM2 [497]. D'autres données suggèrent que HIF1 α formerait un complexe ternaire avec les protéines p53 et MDM2 et inhiberait ainsi l'ubiquitination et la dégradation de p53 [500].

En ce qui concerne les co-activateurs transcriptionnels, les exemples les plus représentatifs sont ceux qu'illustrent les protéines TIP60 et TAFII31.

TIP60 est une acétyl transférase dont la stabilité en réponse aux UV suit les mêmes cinétiques que p53 et qui est importante à l'arrêt du cycle cellulaire [501]. En réponse à l'actinomycine D particulièrement, il a été montré que TIP60 pouvait former un complexe ternaire avec les protéines p53 et MDM2 et que cela aboutissait à la prévention de l'ubiquitination et la dégradation de p53 [501]. Différemment de TIP60, on ne sait pas comment est régulé le co-activateur TAFII31 en réponse aux agents génotoxiques et particulièrement les UV. Cependant après exposition UV, il a été montré que TAFII31 permettait de stabiliser p53 en se liant au suppresseur de tumeur. Cette liaison, qui s'effectue de manière mutuellement exclusive, consiste en la fixation de TAFII31 sur le site d'association de MDM2 sur p53 qui empêche ainsi l'action de MDM2 sur p53 [502].

2. Le facteur de transcription USF1, un nouveau suppresseur de tumeur en réponse au stress UV ?

Si l'implication de la protéine p53 dans la réponse au stress génotoxique et son rôle de suppresseur de tumeur ont été rapidement étayés après sa découverte, celle d'USF1 est aujourd'hui en cours d'exploration. Ainsi, bien que l'on sache qu'USF1 soit important dans la réponse cellulaire au stress environnemental dont les UV, ses rôles dans la prévention de l'instabilité génomique et plus largement dans les processus anti-tumoraux restent ouverts [358,359].

Par la suite, nous décrirons dans un premier temps la structure générale des protéines USF et plus particulièrement USF1, afin de montrer quels sont les domaines fonctionnels importants pour l'activité cellulaires de cette protéine. Dans un deuxième temps, nous décrirons, le lien étroit existant entre le facteur USF1 et le stress cellulaire. Enfin, dans un troisième temps, nous introduirons les connaissances sur le rôle antiprolifératif d'USF1 et les questions qui se posent sur cette fonction particulièrement en réponse au stress UV.

2.1. Structure et domaines fonctionnels des protéines USF

2.1.1. Gènes codants pour les protéines USF

Les protéines de la famille USF regroupent les facteurs de transcription USF1 et USF2 [503]. Ces facteurs, initialement mis en évidence par leur capacité à se fixer et à activer le promoteur majeur tardif de l'adénovirus, sont codés par deux gènes distincts (**Figure 23A**) [504–507]. Le gène *USF1*, présent sur le chromosome 1 chez l'Homme et 7 chez la souris, code pour une protéine nucléaire phosphorylable. Ce dernier est composé de 10 exons qui permettent de générer une protéine de 311 acides aminés et d'un poids moléculaire de 43KDa (**Figure 23A et B**). L'organisation du gène *USF2*, sur le chromosome 19 chez l'Homme et la souris, est similaire à *USF1*. Celui-ci code également pour une protéine phosphorylable de 342 acides aminés et d'un poids de 44KDa (**Figure 23A et B**) [358,508–513]. Des variants d'épissages, particulièrement décrits pour le gène *USF2*, permettent de générer des formes tronquées fonctionnellement associées à un effet dominant négatif sur les protéines USF [509,514–516].

2.1.2. Domaines fonctionnelles des protéines USF

Les protéines USF appartiennent à la superfamille des facteurs de transcription du groupe B de type bHLH/LZ qui regroupe entre autres les facteurs c-Myc, Max, TFE ou MTF. Ces derniers se caractérisent par leur capacité à se fixer à des séquences consensus palindromiques de type CANNTG [503,517]. La spécificité de fixation des différentes bHLH/LZ à ces séquences dépend de la nature des nucléotides centraux (NN), des séquences flanquantes en 5' et en 3' et de l'organisation des acides aminés basiques dans le domaine de fixation à l'ADN [503,518]. Ainsi, les facteurs USF se fixent avec une importante affinité aux boîtes E de séquence **CACGTGAC** [504,518–521]. A titre d'exemple et à la différence d'USF1, la présence de Thymine en 5' est nécessaire à la fixation du facteur MTF sur les boîtes E et, MTF reconnaît avec une plus grande affinité les boîtes M de type **TCATGTTG** [522].

L'organisation des protéines USF comprend de la partie N-terminale à C-terminale (**Figure 23A et B**): un domaine USR important pour l'activité transactivatrice, un domaine basique nécessaire à la fixation des protéines sur l'ADN,

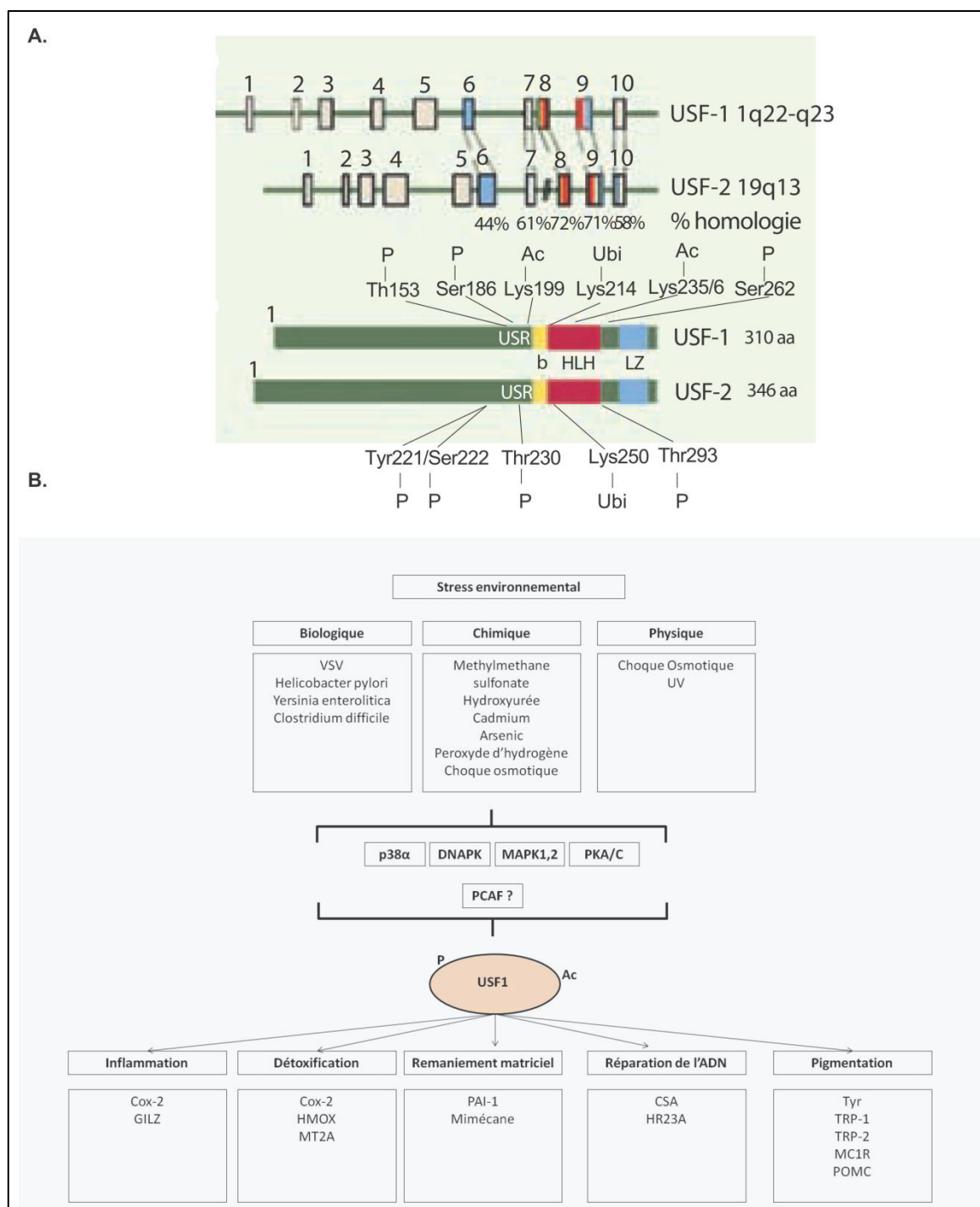


Figure 23 : Domaines fonctionnels et intervention de la protéine USF1 dans la réponse au stress environnemental.

A. Structure et domaines fonctionnels des protéines USF1 et USF2 avec leurs différents sites de modification post-traductionnels. Il est à noter que les modifications post-traductionnelles indiquées ne sont pas toutes forcément initiées par l'exposition UV (Adaptation et remaniement à partir de réf. [358,359] et de la base de donnée phosphosite <http://www.phosphosite.org> consultée le 01/08/13). B. Schéma représentant les différents stress capables de moduler l'activité transcriptionnelle d'USF1. (Réalisation à partir de la synthèse des références citées dans le corpus.)

des domaines HLH et LZ qui sont impliqués dans l'homo- ou l'hétérodimérisation des protéines USF. Les protéines USF peuvent ainsi former des dimères de type USF1/USF1, USF1/USF2 ou USF2/USF2 qui peuvent tous être retrouvés liés à l'ADN [^{358,359,507-509,514,517,523}]. De plus, les protéines USF peuvent également former des multimères entre eux ou même des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcription [^{514,524,525}]. Pour les dimères de protéines USF, si USF1 et USF2 sont exprimées de façon ubiquitaire, il a été montré que le ratio des différents dimères peut être différent en fonction du type tissulaire [^{514,526}].

De façon remarquable, les protéines USF1 et USF2 partagent une importante similitude de séquence sur les régions USR et bHLH (**Figure 23A**). Néanmoins, les deux protéines se singularisent par leur région N-terminale en amont de l'USR et

dans les régions LZ [^{507,509}]. Ces différences, particulièrement dans la partie N-terminale, influenceraient l'activité transactivatrice et les fonctions cellulaires propres aux deux protéines [^{509,527,528}]. Néanmoins, l'activité des deux protéines est complémentaire et vitale pour le fonctionnement cellulaire. Ainsi, de façon isolée, le KO de l'une des protéines affecte le développement murin, mais le KO des deux protéines simultanément est létale [⁵²¹].

Enfin, si la protéine USF2 est importante à l'activité cellulaire d'USF1 et vice et versa [⁵²¹], les fonctions cellulaires des deux protéines ne sont pas complètement redondantes. Ainsi, USF1 est la protéine majoritairement associée à la régulation de la transcription stress dépendante.

2.2. Implication d'USF1 dans la transcription générale et, la transcription stress dépendante

Le contrôle de la transcription par le facteur USF1 s'effectue à deux niveaux. Le premier niveau concerne son interaction avec les facteurs de transcription généraux dans l'environnement de promoteurs TATAA ou de séquence Inr dans les promoteurs TATAA-less. Le deuxième niveau concerne la transcription de gènes spécifiques en fonction de l'état cellulaire et du stress environnemental.

2.2.1. Intervention de la protéine USF1 dans la transcription générale

Concernant la transcription générale, il a été montré qu'USF1 en interagissant avec de nombreux facteurs du complexe de pré-initiation intervient de façon importante dans l'activation de la transcription [^{505,529}]. USF1, en se fixant aux boîtes E dans l'environnement de promoteur TATAA, permet notamment le recrutement de TAFII55. Ce dernier, permet en retour le recrutement des différentes sous-unités du complexe TFIID à l'ADN. USF1 participe ainsi à l'amorçage de la fixation de TFIID aux boîtes TATAA et la formation du complexe d'initiation de la transcription [^{521,530,531}]. Dans cette fonction et selon le type cellulaire, USF1 peut également

interagir avec d'autres facteurs de transcription comme SP1 ou TFII-I pour favoriser l'activation de la transcription à partir de séquences Inr [^{521,531–533}].

2.2.2. Intervention de la protéine USF1 dans la transcription stress dépendante

2.2.2.1. Modifications post-traductionnelles d'USF1 en réponse au stress

La régulation de la transcription par USF1 en réponse au stress fait intervenir la modulation de sa fixation sur les boîtes E. Le nombre de ces dernières est particulièrement élevé dans le promoteur de plusieurs gènes intervenant dans la réponse aux agents biologiques, chimiques et/ou physiques. Les mécanismes de réponse à ces différents types de stress font intervenir parfois la régulation de l'expression du facteur de transcription [⁵³⁴] mais, la modification post-traductionnelle du facteur USF1 par les kinases de stress reste l'événement le plus fréquemment observé (**Figure 23B**). La phosphorylation en Thr¹⁵³ par la kinase p38α intervient de façon dose dépendante de stress variés. Ces stress comprennent : les agents chimiques oxydants, alkylants, hyper-osmotiques, les agents biologiques viraux et bactériens, et les agents physiques comme les UV [^{186,360,511,512}]. D'autres voies interviennent également dans la modification post-traductionnelle d'USF1 en réponse au stress. Il a ainsi été observé que les voies MEK/ERK, PKA, PKC et DNAPK, toutes connues pour être activables en réponse à l'exposition UV (Chap.2, sect.2.1. et 3.3.) , peuvent également phosphoryler USF1 en Thr¹⁵³ et/ou en Ser²⁶² [^{534–537}].

Il est à noter que la phosphorylation d'USF1, selon le modèle cellulaire, peut également aboutir à l'inhibition de la fixation d'USF1 sur le promoteur de certains gènes [⁵³⁸]. A l'instar de ce contrôle négatif d'USF1 limité à certain types cellulaires, la phosphorylation combinée à l'acétylation sur les résidus Lys¹⁹⁹ constitue un des moyens les plus importants pour inhiber l'activité transcriptionnelle d'USF1 en réponse au stress environnemental dont les UV (**Figure 23B**) [^{358–360}]. Dans ce cadre, si l'action de la kinase p38α est primordiale, l'acétyl transférase en jeu n'est pas encore caractérisée.

En lien avec cette dernière information, il est important de préciser que l'acétylation d'USF1 peut être une modification importante pour promouvoir d'autres fonctions d'USF1. Ainsi, l'acétylation d'USF1 en Lys²³⁷ a particulièrement été impliquée dans le recrutement et l'assemblage de certains complexes protéiques au niveau de l'ADN. Cela concerne à titre d'exemple, la régulation transcriptionnelle des enzymes intervenant dans le métabolisme des lipides après phospho-acétylation par l'action conjointe de la kinase DNAPK et de l'acétyl transférase PCAF [^{537,539}]. Au final, l'importance de l'acétylation d'USF1 dans les interactions protéines-protéines, particulièrement en réponse au stress cellulaire, reste un sujet peut étayer dans la littérature.

2.2.2.2. Stress inducteurs et cibles transcriptionnelles d'USF1

USF1 a été identifié comme un véritable senseur du stress environnemental. Ce "sensing" intervient en réponse à des agents variés de nature biologique, chimique et physique. En réponse à ces agents, USF1 est capable d'intervenir sur plusieurs types de mécanismes de protection dont ; l'inflammation, la détoxification, le remaniement matriciel, la réparation de l'ADN ou la pigmentation (**Figure 23B**).

Parmi les cibles transcriptionnelles activées de manière USF1 dépendante lors d'un stress biologique, les gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et la réponse inflammatoire sont majoritairement décrits. La fixation à l'ADN et l'activité transcriptionnelle d'USF1 peuvent ainsi être modulées après infection: par le VSV (Virus de la Stomatite Vésiculaire) [360], l'*Helicobacter Pylori* [535], le *Yersinia Enterocolitica* ou le *Clostridium Difficile* [540]. De façon générale, l'action de ces agents passe par l'activation des kinases de stress qui modulent par phosphorylation l'activité d'USF1 ou plus rarement l'expression de la protéine USF1. Parmi les cibles transcriptionnelles d'USF1, l'expression de *COX-1/2* ou *GILZ* intervient respectivement en tant que promoteur ou inhibiteur de l'inflammation [535,540,541].

Dans la réponse aux agents chimiques, USF1 a été impliqué dans le contrôle de gènes importants dans la détoxification cellulaire, la différenciation et l'inflammation. Ainsi, USF1 contrôle l'expression des gènes : *COX-2* [540,542], *HEMOX* [543] ou *MT2A* [544,545] en réponse aux agents oxydants, alkylants et aux métaux lourds.

L'implication d'USF1 dans la réponse au stress physique concerne majoritairement les UV. Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment (Chap.2, sect.3.3.), USF1 contrôle l'expression de gènes impliqués dans la pigmentation comme *TYR*, *TRP-1*, *DCT*, *MC1R* et *POMC* [186,187,358–360]. D'autre part, USF1 est également impliqué dans le contrôle de gènes nécessaires à la réparation de l'ADN par excision de nucléotides comme *HR23A* et *CSA* [226]. L'action d'USF1 en réponse aux UV comprend également la modification indirecte de l'activité cellulaire par le biais du remaniement matriciel. Ainsi, il a été montré qu'USF1 contrôle le gène codant pour le mimécane en réponse aux UV [546]. De la même manière, USF1 est impliqué dans la régulation du gène *PAI-1* (inhibiteur de type 1 de l'activateur du plasminogène) après stimulation par le facteur de croissance TGFβ dont l'expression est connue pour être modulée en réponse aux UV [290,366,547–549]. A ce niveau, il est important de noter que la régulation du *PAI-1* pourrait faire intervenir USF1 ou USF2 jouant respectivement le rôle de répresseur ou d'activateur de l'expression du *PAI-1*.

En réponse aux UV, si l'action d'USF1 a été mise en évidence sur les gènes contrôlant la réparation de l'ADN, la pigmentation ou le remaniement matriciel, son influence sur le contrôle du cycle n'est pas connue. Pourtant, ce processus est capital dans la prévention de l'instabilité génomique promue par les UV. De façon intéressante, USF1 est majoritairement défini dans la littérature comme un facteur antiprolifératif, suggérant un rôle potentiel de cette fonction dans la réponse aux UV.

2.3. Rôle antiprolifératif d'USF1, impact potentiel dans la réponse UV ?

Le lien entre le cycle cellulaire et les facteurs USF a été mis en évidence pour la première fois par Cogswell et collaborateurs en 1995. Dans les cellules Hela, cette équipe montrait que le facteur USF1 se fixait et activait des boîtes E fonctionnelles dans le promoteur du gène codant pour la cycline B1. De cette manière, USF1 a été décrit comme nécessaire pour la progression dans le cycle cellulaire particulièrement dans la transition G2/M [550]. Il a fallu les études des groupes de Sawadogo et Pognonec pour montrer qu'USF1 n'était pas un oncogène mais au contraire exerçait des fonctions de suppresseur de tumeur. Les deux équipes mettent en évidence que la surexpression des facteurs USF en générale et d'USF1 en particulier sont capable de contrecarrer la transformation cellulaire médiée par les oncogènes Ras ou c-Myc dans des cultures primaires de fibroblastes [551,552]. Ce rôle anti-prolifératif a été confirmé par l'identification de la perte de l'activité transcriptionnelle des facteurs USF, dont USF1, dans 50% de lignées de carcinome mammaire [528,553]. Des limitations à cette fonction ont été suggérées. Aussi, l'action antiproliférative d'USF1 est dépendante du contexte cellulaire mais également d'interactions protéine-protéine avec d'autres co-facteurs transcriptionnels restant à identifier [527,554].

En lien avec ces études qui proposent USF1 comme un potentiel gène suppresseur de tumeur, USF1 a été impliqué dans le contrôle des gènes, *CCND1* [555], *CDK1* [556], *CDK4* [528], *HTERT* [557,558], *APC* [559], *BRCA2* [560]. De façon intéressante, l'ensemble de ces gènes ont un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire et leur dérégulation est étroitement liée à la transformation cellulaire. Malgré l'identification de toutes ces cibles importantes pour le contrôle du cycle cellulaire, aucune donnée ne précise le rôle antiprolifératif du facteur USF1 dans la prévention de l'instabilité génomique dans le contexte de l'exposition UV.

Cette observation devient essentielle au vue des liens forts qu'ils existent entre USF1 et le suppresseur de tumeur p53. En effet, les deux facteurs sont activés dans des cinétiques comparables et par des kinases de stress communes comme DNAPK [398,472,534,537] ou p38 α [186,213,214,360]. Les deux facteurs contrôlent la transcription de mêmes cibles impliquées dans le contrôle de l'instabilité génomique comme *APC*, *BRCA2* ou *HTERT* [557,559–563]. Enfin, il a été montré qu'USF1 était nécessaire à fois à la transcription basale du gène codant p53 [444,445] et dans la formation de boucle dans l'ADN permettant d'orienter le choix de certaines cibles transcriptionnelles de p53 [564]. De manière cruciale, il a été montré qu'USF1 n'avait aucune activité antiproliférative dans les cellules SaoS-2 déficientes pour p53 [527]. Collectivement, ces observations suggèrent un lien fonctionnel important entre les protéines USF1 et p53 dans le contrôle de l'instabilité génomique induit par les UV qu'il reste à définir.

Chapitre 4 Contexte, travaux et résultats de thèse

1. Introduction

1.1. Contexte scientifique et problématique

L'exposition aux UV constitue une source carcinogénique majeure pour les cellules de l'épiderme. Les UVB, particulièrement absorbés par l'ADN, engendrent des lésions qui en absence de mécanismes de réparation efficaces peuvent conduire à une instabilité génomique et à la transformation maligne des cellules [36,45,47,51,52]. Ainsi, l'exposition aux rayons UV solaires, intermittente ou chronique, constitue un facteur de risque majeur dans le développement de néoplasmes cutanés. La majorité de ces tumeurs comprennent des cancers peu agressifs et rarement métastatiques comme les carcinomes basocellulaires et spinocellulaires. En revanche, s'ils constituent une faible proportion des cancers cutanés, les mélanomes, très agressifs et souvent métastatiques ont la plupart du temps une issue fatale [22,23,95,354]. Les mécanismes cellulaires de protection contre les effets délétères des UV s'avèrent ainsi capitaux dans la prévention de l'instabilité génomique des cellules cutanées. Dans ce cadre l'activité de plusieurs facteurs de transcription s'avère critique pour mobiliser des mécanismes permettant la restauration d'une information génétique correcte ou, en cas de dommages irréversibles, de programmer la mort cellulaire.

Parmi les différents facteurs de transcription associés à la réponse cellulaire au stress UV, la protéine p53 fait partie des acteurs essentiels des systèmes de protection cellulaire. p53 s'illustre comme un véritable rhéostat permettant d'adapter le comportement cellulaire en fonction du niveau de dommages induit par l'exposition UV [152,153,239,287,288,373,374,385,397,398]. Dans ce sens, sa disponibilité corrèle parfaitement à l'état cellulaire et, en fonction de celui-ci, au programme transcriptionnel à mettre en place afin d'éviter la transmission d'une information génétique erronée avant la division cellulaire [380,381,395,396,398,565]. Dans la cellule non lésée, la protéine p53 est maintenue à un niveau quasi indétectable grâce à la protéine MDM2, une ubiquitine ligase de type E3, exprimée de façon constitutive [382-385]. L'association physique du couple p53-MDM2 est rapidement inhibée en présence de dommages cellulaires par le biais d'une coopération complexe entre les kinases de stress et d'autres entités protéiques dont la nature peut être variée [407,411,416,417,452,456-458]. Les modifications post-traductionnelles de p53 et/ou de MDM2, ainsi que leurs associations à différentes protéines, abrogent l'interaction du couple p53-MDM2 et favorisent la stabilisation et l'activation de p53. Activée, la protéine p53 agit par l'intermédiaire d'un réseau transcriptionnel complexe faisant intervenir des gènes impliqués dans l'arrêt transitoire du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la pigmentation [107,108,367,395]. L'importance de p53 est particulièrement illustrée par sa perte de fonction, germinale ou somatique, qui prédispose à de nombreux cancers dont les mélanomes [72,78,110,112-117,142,377,378]. De plus, dans le cadre du mélanome particulièrement, la réactivation de p53 fait l'objet d'importantes investigations afin d'améliorer les stratégies thérapeutiques dans ce cancer encore aujourd'hui incurable [566-573].

La régulation du programme génétique médiée par la protéine p53 est très complexe et encore aujourd'hui difficile à prévoir. Ainsi, de nombreux régulateurs de la disponibilité de p53 existent pour assurer vraisemblablement une spécificité dans la réponse cellulaire en fonction du type et du niveau de stress génotoxique. Parmi ces régulateurs, les facteurs de transcription exercent une influence majeure sur la stabilité et l'activité de la protéine p53. Ces derniers peuvent agir à la fois par le biais de leur activité transcriptionnelle intrinsèque pour assurer l'expression basale de p53 mais également indépendamment de leur activité transcriptionnelle pour moduler la stabilité de p53. Ainsi, des facteurs comme YY1 sont à titre d'exemple capables d'assurer ces deux types de fonctions afin de réguler l'apoptose dépendante de p53 [391,420,490,491]. De façon restreinte à la régulation post-traductionnelle de p53, les facteurs TAFII31, ATF3, HIF1- α ou 14-3-3 sigma assurent la stabilisation de p53 et influencent son action différentielle sur le contrôle du cycle et/ou de l'apoptose [211,392,413,495,497,500,502,574-576].

USF1 est un facteur de stress étroitement lié au programme génétique médié par la protéine p53, néanmoins aucun lien fonctionnel n'a jusqu'à aujourd'hui été mis en évidence entre les deux protéines particulièrement en réponse au stress UV. Pourtant, notre équipe a montré qu'USF1 était important pour la réparation de l'ADN et la pigmentation en réponse à l'exposition UV [186,187,226,360]. D'autre part, nos études ainsi que celles d'autres équipes, ont impliquées plus largement USF1 comme un véritable senseur du stress environnemental permettant de moduler l'inflammation, le remaniement matriciel ou la détoxification cellulaire en réponse aux agents, biologiques, chimiques et physiques [357-360,535,540,542-546]. L'ensemble des mécanismes où intervient USF1 le font aujourd'hui apparaître comme un élément prépondérant dans la protection cellulaire. Cette observation prend une dimension encore plus importante au vu des liens potentiels qu'ils existent entre les protéines USF1 et p53.

En effet, USF1 et p53 sont activés par les mêmes kinases dont p38 α , et dans des cinétiques similaires en réponse au stress génotoxique dont les UV [186,213,214,360,511,512]. Ils partagent également des cibles transcriptionnelles communes, comme *APC*, *BRCA2* et *hTERT*, qui interviennent dans le contrôle du cycle et dans la prévention de l'instabilité génomique [557-563]. USF1 a de plus été décrit comme important dans la régulation basale de l'expression de p53 et, USF1 est nécessaire au contrôle différentiel de certains promoteurs par p53 [444,445]. De plus, USF1 a été décrit comme un facteur antiprolifératif avec des fonctions potentielles de suppresseur de tumeur [551,553,554,577]. Il a été d'autre part observé que le facteur USF1 n'exerçait plus de fonction antiproliférative dans un fond invalidé pour p53 [527]. Malgré ces résultats reliant potentiellement les facteurs USF1 et p53 aucune donnée fonctionnelle ne précise le rapport entre les deux facteurs particulièrement en réponse au stress UV.

1.2. Questions scientifiques adressées

Afin d'étudier le lien fonctionnel potentiel entre les protéines USF1 et p53, nous avons mis en place plusieurs études *in vivo* et *in vitro* basées sur l'analyse de la réponse aux UV dépendante de p53 dans des modèles déficients pour *USF1*.

Une première étape de notre étude a consisté à tester la **fonctionnalité de la protéine p53 dans le tissu cutané murin et dans des cellules cutanées déficientes pour *USF1***. Notre attention s'est focalisée sur la réponse précoce après exposition des **différents modèles à des doses physiologique d'UVB**. Les résultats de cette étude ont été revus par le journal Plos Genetics et les révisions demandées ont été adressées à l'éditeur (Article 1 et Annexes n°1 à 4, Bouafia, en révision 20/01/ 2014).

Dans un deuxième temps, nous avons évalué **l'implication de l'activité transcriptionnelle intrinsèque des facteurs *USF1* et *p53*** sur le contrôle transcriptionnel du gène *CDKN1A* codant pour la protéine p21^{Waf1/Cip1}. Ces travaux ont été menés en collaboration avec le Dr. Corre et vont être soumis au journal PCMR (Article 2 et Annexe n°5, Corre, Bouafia, en cours de soumission 20/01/2014).

Dans un troisième temps, nous avons mis en place une stratégie de type **microarray afin d'identifier les réseaux transcriptionnels contrôlés par la protéine *USF1*** en réponse à l'exposition UVB. Ces travaux en cours de formalisation feront l'objet dans ce manuscrit de thèse d'une partie dite "résultats supplémentaires".

2. Résultats

2.1. Lien fonctionnel entre les protéines *USF1* et *p53* en réponse à l'exposition UV

2.1.1. Article 1, *USF1* est nécessaire à la stabilisation et à l'arrêt transitoire du cycle cellulaire dépendant de *p53* en réponse à l'exposition UV

La protéine p53 connue sous le nom de « gardien du génome » est un élément prépondérant de la réponse aux UV, et plus largement dans la prévention de l'instabilité génomique promue par les agents génotoxiques [107,416,417,452]. L'importance de p53 est par ailleurs illustrée par l'implication de sa perte de fonction dans l'étiologie des cancers cutanés dont l'exposition UV est un facteur de risque majeur. Dans ce cadre, les stratégies de réactivation de p53 constituent aujourd'hui des axes importants dans la recherche d'approches thérapeutiques contre plusieurs cancers comme le mélanome dont l'issue est souvent fatale [566–568,570–573].

En réponse au stress UV, l'abrogation de l'action de MDM2 sur la dégradation constitutive de la protéine p53 constitue une étape fondamentale dans la stabilisation et l'activation des fonctions du suppresseur de tumeur. Stabilisée, la protéine p53 mobilise immédiatement un vaste réseau génétique permettant d'arrêter transitoirement le cycle cellulaire ou, en cas de dommages irréversibles, l'apoptose [107,416,417,452]. Nous avons identifié qu'*USF1*, un facteur de transcription associé au stress, était crucial dans la stabilisation de p53 et dans la promotion de son programme transcriptionnel nécessaire au contrôle du cycle cellulaire dans le tissu

cutané murin exposé à des doses physiologiques d'UVB (**Article 1**). De façon originale, nous avons montré que la stabilisation de p53 par USF1 est indépendante de son activité transcriptionnelle intrinsèque. En réponse au stress UV, nous avons découvert qu'USF1 s'associe physiquement à p53 et interfère dans la liaison du couple p53-MDM2. En conséquence, l'association physique d'USF1 à p53 réduit l'ubiquitination de la protéine p53 et sa dégradation médiée par MDM2. Au niveau physiologique, nous démontrons que l'absence d'expression d'USF1 altère l'arrêt transitoire G1/S dépendant de la protéine p53 et conduit à une accumulation de dommages à l'ADN. Collectivement, nos données montrent que l'action de p53 sur le comportement cellulaire en réponse à l'exposition UV est dépendante du facteur de réponse au stress USF1. Ils suggèrent d'autres parts que la perte potentielle d'USF1 puisse constituer un facteur promoteur d'instabilité génomique en cas d'exposition à des agents environnementaux génotoxiques.

2.1.1.1. Copie de l'Article 1

p53 requires the stress sensor USF1 to direct appropriate cell fate decision

Amine Bouafia^{1, 2}, Sébastien Corre^{1, 2}, David Gilot^{1, 2}, Nicolas Mouchet^{1, 2}, Sharon Prince⁴ and Marie-Dominique Galibert^{1, 2, 3, *}

1 CNRS-UMR6290 Genetic and Development Institute of Rennes, GEO Team

2 Université de Rennes 1, UEB, SFR Biosit, Rennes, France

3 CHU Rennes, Laboratoire de Génomique Médicale, Rennes, France

4 Department of Human Biology, Faculty of Health Sciences, University of Cape Town, South Africa

* E-mail: mgaliber@univ-rennes1.fr

Running head: USF1 regulates p53 protein stability

Abstract:

Genomic instability is a major hallmark of cancer. To maintain genomic integrity, cells are equipped with dedicated sensors to monitor DNA repair or to force damaged cells into death programs. The tumor suppressor p53 is central in this process.

Here, we report that the ubiquitous transcription factor Upstream Stimulatory factor 1 (USF1) coordinates p53 function in making proper cell fate decision.

USF1 stabilizes the p53 protein in the nucleus and promotes a transient cell cycle arrest, in presence of DNA damage. Thus, cell proliferation is maintained inappropriately in *Usf1* KO mice and in USF1-deficient melanoma cells challenged by genotoxic stress. We further demonstrate that the loss of USF1 compromises p53 stability by enhancing p53-MDM2 complex formation and cytoplasmic MDM2-mediated degradation of p53. In USF1-deficient cells, the level of p53 can be restored by the re-expression of full-length USF1 protein similarly to what is observed using nutlin-3, the MDM2 specific inhibitor. Consistent with a new function for USF1, a USF1 truncated protein lacking its DNA-binding domain can also restore the induction and activity of p53. Together these results demonstrate that USF1 acts as a competitive inhibitor sequestering p53 away from MDM2 to regulate cell fate.

These findings establish that p53 function requires the ubiquitous stress sensor USF1 for appropriate cell fate decision. They underscore the new role of USF1 and gives new clues of how p53 loss of function can occur in any cell types. Finally, these findings are of clinical relevance giving new therapeutic prospects in reactivating the p53 pathway in melanomas.

Introduction:

Genomic instability is a central hallmark of cancer, where DNA damaging agents play an important role [1-2]. The transformation of normal cells into cancer ones requires the succession of alterations in the genome that alter key physiological regulatory processes. In DNA-damaged eukaryotic cells, genome integrity is maintained by an immediate and inducible protective program. This program requires dedicated sensors that drive and regulate the cellular response, by monitoring DNA-repair and if required by forcing damaged-cell into cell death pathways [3]. When these sensors are compromised, sensitivity to mutagenic agents is increased and mutation rate speeds up, allowing tumor development. The extent of DNA lesions and the capacity of dedicated sensors to direct a proper response are thus determinant parameters of cell life.

To date, the tumor suppressor p53 is the most important sensor [4], being a central and early regulator of the DNA-damage response. Upon recognition of DNA damage, p53 induces a transient growth arrest by holding the cell cycle at the G1/S regulation point. p53 acts through activating the expression of the cell-cycle arrest gene *CDKN1A* (*p21*) [5-6-7], allowing DNA repair and thereby preventing the development of cancer. This p53-dependent transient cell cycle arrest is thus a decisive step that requires the stabilization of p53 protein. Indeed, in the absence of cellular stress, p53 is maintained at low steady-state levels by the dynamic p53-MDM2 feedback loop [8]. In response to DNA-damage signaling, the p53 protein undergoes extensive post-translational modifications including phosphorylation by DNAPK, ATM and ATR, all members of the PI3K family [9]. These modifications nucleate subsequent changes in the repertoire of proteins interacting with p53 and in particular abolish the p53-MDM2 interaction [10]. This results in the immediate increase in p53 levels and transcriptional activity, thereby directing cell fate decision [11-12-13].

The Upstream Stimulatory Factor 1 (USF1) is a ubiquitous transcription factor of the basic-helix-loop-helix leucine-zipper family that operates as a stress sensor. USF1 is a direct target of the p38 stress-activated kinase and genetic studies demonstrate that USF1 is a transcriptional rheostat for the stress response [14-15-16]. In response to UV-radiation, a physiological source of direct DNA-damage, known as the major risk factor for skin cancers [17-18-19-20], USF1 regulates the expression of pigmentation genes [15],

and genes of the nucleotide excision repair pathway (NER) [21]. This protective function of USF1 is important since central to the maintenance of genome stability is the repair of DNA damage.

The USF1 and p53 pathways both have pivotal roles in the response to stress, where they participate in the immediate molecular and cellular responses. They regulate common biological processes to mitigate deleterious effects. Both pathways have been studied in detail, but little is known about any crosstalk between them, although an *in vitro* study suggested that USF1 may regulate the basal transcription of the *p53* gene [22]. We thus examined whether USF1 could contribute to the canonical p53 stress response by directing proper cell fate decision. We used a combination of *in vivo* and *in vitro* genetic approaches to test for the presence of a coordinated USF1/p53 program. We demonstrate that in presence of DNA damage USF1 is necessary for immediate p53 protein stabilization and that the p53-mediated cell cycle arrest requires USF1. We report evidence that USF1 is a central regulator of p53 to direct cell fate decision, identifying thereby a new functional and unexpected role for USF1. Collectively, these findings have important and broad consequences for our understanding of mechanisms that maintain stress-induced DNA damage and cancer promotion.

Results:

USF1-deficient mouse skin is unable to up-regulate p53 in presence of DNA damage

To identify a coordinated USF1/p53 program, we first examined p53 expression (by assaying mRNA and protein levels) and p53 acute stress response in *Usf1*^{-/-} mice. Mice were challenged with UVB irradiation, a physiological inducer of direct DNA-damage, known to activate the p53 pathway [23]. We quantified *Trp53* mRNA in skin cells from *Usf1* KO mice and WT littermates (n=9 for each genotype) and found no significant difference between the two genotypes both before and 5 hours after UVB radiation (Figure 1A). Similarly, the basal level of the p53 protein was comparable in the two genotypes. However, while a significant and reproducible 2-fold increase of the p53 protein was observed in WT littermates 5 hours post-UVB irradiation, p53 protein-levels remained unchanged in *Usf1*^{-/-} mice. Phosphorylation of the H2AX histone (γ H2AX), a substrate of the DNAPK/ATM/ATR axis [24-25], increased following irradiation in both genotypes confirming comparable signal transmission of UVB-induced DNA damage (Figure 1B). Levels of p53 remained lower in *Usf1*^{-/-} mice compared to than WT littermates 12h post-irradiation. This ruled out the possibility that the p53 response in *Usf1*^{-/-} mice was simply delayed (data not shown). Following UVB-irradiation, the *p21*, *14-3-3 sigma* and *PCNA* genes were less strongly induced in *Usf1*^{-/-} than control mouse skin both *in vivo* (*Usf1*^{-/-} mouse skin; Figure S1A) and *ex vivo* (*Usf1*^{-/-} cultured skin biopsies; Figure S1B). Thus, the absence of induction of p53 in the *Usf1*^{-/-} mice was accompanied by weaker up-regulation of p53 target genes required for the DNA-damage response.

Trp53-deficient mice have reduced DNA repair ability and impaired cell cycle arrest in response to DNA-damaging agents [26-27]. We therefore used immunohistochemistry (IHC) to examine the effect of USF1 deficiency on these processes. Levels of CPD in the epidermis and dermis and in the bulge region, 5 hours post-irradiation, were higher in *Usf1*^{-/-} mice than WT littermates (Figure 1C). This was confirmed by ELISA, which showed that there was twice as much CPD in *Usf1*^{-/-} mouse skin (5h post-UV; n=4, p<0.05) (Figure 1D). We next examined the proliferation index of epidermal cells by IHC using Ki-67, the cellular marker of cycling cells [28]. In non UV-exposed skin, the proliferation index in the inter-follicular areas was comparable in the two genotypes. In response to UVB irradiation, however, the proliferation index remained constant in *Usf1*^{-/-} mice whereas it decreased by approximately 50% in WT littermates (Figure 1, E and F). Thus, in addition to defective

induction of p53 protein upon UVB exposure, *Usf1* deficient cells fail to down-regulate their cell cycle despite the presence of DNA damage.

USF1 is required for p53-dependent G1/S arrest upon genotoxic stress

To decipher the specific contribution of USF1 and p53 proteins to the regulation of cell cycle progression upon genotoxic stress, we generated stable knock-down (KD) cell lines and synchronized them in G1/early S phase. The effectiveness of the shRNAs used to knock down *Usf1* and *Trp53* was verified (Figure 2, A and B). Levels of *Trp53* mRNA were comparable in *Usf1* KD and control cells (sh-CT) and remained unchanged in response to UVB, whereas the level of p53 protein increased only in UVB-irradiated control cells (Figure 2, A and B). The mRNA and protein levels of p21, the p53-dependent effector of the G1/S arrest, remained low in both *Usf1* KD and *Trp53* KD cells in response to UVB, whereas they increased in control cells. Furthermore, consistent with findings for *Usf1*^{-/-} mice, time course experiments showed that there was no delayed UV-induced p53 and p21 up-regulation in *Usf1* and *Trp53* KD cells (Figure S2A). These findings showed that the KD cell culture models reproduced features of *Usf1*^{-/-} mice. To examine S phase progression upon genotoxic stress, we followed the synthesis of DNA by measuring the incorporation of a thymidine analog (BrdU). The results show that the proliferation rates of synchronized *Usf1* and *Trp53* KD cells were similar to that of control cells (Figure 2C). However, in the UVB-irradiated condition, while the number of BrdU-incorporating cells remained unchanged and comparable for the *Usf1* and *Trp53* KD cells, irradiated control cells exhibited a significant reduction, of 50%, in the number of BrdU-incorporating cells. Similar results were obtained using primary fibroblasts isolated from *Usf1*^{-/-} mice and *Usf1*^{+/+} littermates (Figure S3). These data are consistent with the *in vivo* results (Figure 1, E and F). In addition, USF1 levels did not differ between *Trp53* KD cells and controls, indicating that USF1 expression is not dependent on p53 (Figure 2, A and B). This also suggests that the deficiency in cell cycle arrest of *Usf1* KD cells in response to genotoxic stress may be the result of the absence of increased levels and/or activity of p53 and p21.

The loss of p53 is a critical event that promotes tumor growth. We therefore investigated whether loss of USF1 favors tumor growth *in vivo* under stress conditions. To this end, we injected NOD/SCID mice subcutaneously with mock- or UVB-irradiated, *Usf1* and *Trp53* KD cells, and examined tumor growth 12 days later. The tumors produced by

UVB-irradiated control cells were half the size of those produced by mock-irradiated control cells (Figure 2D). *Usf1* and *Trp53* KD cells both generated massive tumors and their sizes were not modified by UV-pretreatment (Figure 2D). This demonstrates that USF1, like p53, is required for the transient cell cycle arrest in order to delay cell proliferation in response to induced DNA damage.

USF1 is critical for p53 protein stabilization

We next investigated how USF1 controls p53 protein levels. USF1 was re-expressed in *Usf1* KD cells and we showed that this restored the induction of p53 protein (Figure 3A) and p53 transcriptional activity in response to stress (Figure S2B). The effects of re-expressing USF1 were independent of *Trp53* transcript levels (data not shown) and similar results were obtained with USF1 mutants lacking transcriptional activity (Figure S2C). These observations suggest that USF1 positively regulates p53 protein levels and activity independently of its transcription factor function. Therefore, USF1 may act through translational and/or post-translational mechanisms to modulate p53 availability. Treatment of *Usf1* KD and control cells with MG132 (an inhibitor of proteasome activity) resulted in immediate and similar increases of p53 protein levels in the two types of cells (Figure 3B). This indicates that USF1 prevents the degradation of p53 rather than inducing p53 synthesis. Furthermore, the abundance of USF1 protein in control cells remained unchanged when proteasome activity was inhibited (Figure 3B).

Phosphorylation of p53 is important for its stabilization and is dependent on the activation of the DNA damage signal transducers, DNAPK, ATM and ATR. Since the phosphorylation of serine 15 (Ser15) in the p53 protein is required to nucleate interactions with other proteins to block contact with its inhibitor, MDM2 [29-30], we specifically examined this modification. *Usf1* KD and control cells were treated with MG132 or vehicle and exposed to UVB. In the absence of MG132 treatment, UVB-induced phosphorylation of Ser15 and stabilization of p53 occurred only in control and not in *Usf1* KD cells (Figure 3C). Inhibition of the proteasome degradation pathway in the presence UVB resulted in comparable levels of phosphorylated Ser15 and stabilization of p53 in *Usf1* KD cells and control cells (Figure 3D). These results suggest that while upstream mechanisms of transduction of the DNA-damage signal, targeting p53-stabilization, are functional in *Usf1* KD cells, the absence of USF1 prevents full stabilization of p53.

We next examined whether USF1 modulates the half-life of p53. Cells were pre-treated with MG132 (for 3 hours) to stabilize p53, and time course experiments were performed with the protein translation inhibitor, cycloheximide (CHX) (Figure 3, E and F). The half-life of p53 protein in *Usf1* KD cells was 30 min, and in control cells was 110 min (sh-CT) (Figure 3E). We also examined p53 half-life by irradiating cells before CHX addition: the half-life of p53 was over 180 min in control cells but of only 60 min in *Usf1* KD cells (Figure 3F). To confirm these results *Usf1* KD and control cells were co-transfected with a vector encoding a flag-tag p53 construct and a GFP control construct. GFP was expressed at the same level in the two cell lines, but p53 levels in *Usf1* KD cells were half that in control cells (Figure 3G). We next examined whether impairment of p53 stabilization could be associated with an increase of the rate of p53-ubiquitination in the absence of USF1. To this end, flag-tag p53 was immuno-precipitated from both *Usf1* KD and control cells transfected as above and treated with or without MG132 and UVB. The basal level of ubiquitinated flag-tag p53 was approximately three times higher in *Usf1* KD than control cells (Figure 3H). Following MG132 treatment there was a substantial accumulation of ubiquitinated flag-tag p53 in *Usf1* KD cells. Irradiation following MG132 treatment had almost no effect on the level of ubiquitinated flag-tag p53 in *Usf1* KD cells but this level was half (53%) in control cells. These investigations demonstrate that USF1 interferes with the process of p53 ubiquitination and thereby maintains p53 stability following exposure to genotoxic agent.

USF1 associates with p53 and inhibits MDM2-mediated p53 degradation

MDM2 is the E3-ubiquitin ligase that interacts with p53 to promote p53 degradation by the proteasome and is therefore a central regulator of p53 stability [8]. We thus examined whether USF1 binds p53 and thereby protects it from interacting with MDM2. *Usf1* KD and control cells were pre-treated with MG132 and following exposure to UVB, immunoprecipitation assays were performed with antibodies to either USF1 or MDM2 (Figure 4, A and B). The p53 protein co-immunoprecipitated with USF1 only in control cells, and the amount of p53 precipitated increased by UVB irradiation (Figure 4A). This demonstrates that USF1 can interact with the p53 complex. The anti-MDM2 antibody precipitated p53 with MDM2 from *Usf1* KD cells but not from the control cells and UVB irradiation had no significant effect (Figure 4B). These results suggest that in the absence

of USF1, the interaction between p53 and MDM2 is favored. These immunoprecipitation experiments showed that USF1 and MDM2 did not interact with one another (data not shown). Also, MDM2 was similarly abundant in both control and knock down cell lines under all conditions tested, indicating that silencing *Usf1* did not interfere with MDM2 levels (Figure 4, B and C). Together these results suggest that p53 binds USF1 and MDM2 in a mutually exclusive manner.

To confirm that the interaction of MDM2 was responsible for the increased degradation of p53 in *Usf1* KD cells, we examined the levels of flag-tag p53 in the presence of nutlin3, a specific inhibitor of the MDM2-p53 interaction (Figure 4D). Consistent with our previous results, the expression of flag-tag p53 in *Usf1* KD cells was half that in control cells. A short treatment (6h) with nutlin3 almost completely restored the level of flag-tag p53 in *Usf1* KD cells. We next compared the ability of MDM2 to degrade p53 in the presence and absence of USF1. Control and *Usf1* KD cells were transiently co-transfected with vectors expressing p53 and MDM2. Whereas co-expression with MDM2 led to a decrease of approximately 70% of p53 protein in *Usf1* KD cells, there was only a 37% decrease in control cells (Figure 4E). When we restored USF1 expression, the degradation of p53 mediated by MDM2 was counteracted (Figure 4F). This provides further evidence that USF1 contributes to protecting p53 from MDM2-mediated degradation.

MDM2 has been reported to promote nuclear export of p53 and thereby target it for degradation [31]. We therefore determined whether USF1 can interfere with MDM2 mediation of p53 cellular localization under conditions described in Figure 4F and using nutlin3. In the presence of nutlin3, the level of p53 was exclusively nuclear and higher compared to control (vehicle). When p53 and MDM2 were co-expressed, p53 was completely degraded confirming the activity of MDM2 on p53. As expected, the presence of nutlin3 almost completely counteracted the MDM2-mediated degradation of p53 and led to accumulation of p53 in the nucleus. Finally, similar to the results obtained for nutlin3, co-expression of USF1 with p53 and MDM2 abolished p53 degradation and maintained nuclear the localization of the p53 protein (Figure 4G). Together, these data demonstrate that USF1 interferes with MDM2-mediated nuclear export of p53 and its subsequent degradation.

Discussion:

Activation of the p53 pathway in response to DNA damage is a critical mechanism that selectively directs the cells to transient cell cycle arrest to favor DNA repair or to promote cell death when DNA damage is irreparable. Disruption of this protective pathway leads to an increase in cells' mutation load promoting genomic instability and frequently cancer development [32]. Our study demonstrates a new role for USF1 as a key upstream regulator of the p53 pathway. We provide compelling evidences that USF1 acts as a competitive inhibitor to prevent MDM2-mediated p53 degradation under stress conditions, thereby ensuring the stability and tumor suppressor activity of the p53 protein. USF1 is thus proposed to direct appropriate p53-dependent cell fate decision (Figure 5).

The transcription factors USF1 and p53 are both associated with the stress response and with cell proliferation [33-34-35]. Although there was evidence suggesting a link between them, this had not been demonstrated *in vivo*. For example, USF1 and p53 regulate the transcription of common target genes including *APC*, *BRCA2* and *hTERT* [18-36-37-38-39-40], and *in vitro* studies implicated USF1 in the basal regulation of the *Trp53* promoter [22-41]. Here, we report that, in mice skin and in B16 melanoma cells, USF1 drives DNA damage-induced cell cycle arrest by regulating p53 protein stability and function. Thus *in vivo* loss of USF1 parallels p53 deficiency [26-42], with altered proliferation control in presence of DNA-damage. And like *Trp53*^{-/-} [43-44] or *p21*^{-/-} cells [5], *Usf1*^{-/-} primary fibroblasts bypass the transient cell cycle arrest triggered by DNA damaging radiation. We further found that under basal conditions the skin of WT and *Usf1*^{-/-} mice contained similar levels of p53 mRNA and protein, but observed differences in p53 protein levels between the two genotypes after UVB challenge. Despite previous suggestions, we could not demonstrate a transcriptional link between USF1 and p53 [22-41]. This could possibly be attributed to cell specificities or stress-dependent contexts in which levels and activities of transcriptional factors, required to drive *Trp53* gene expression may vary [45]. Indeed, in studies involving human skin and keratinocytes UV-induced p53 was shown to be regulated only at the post-translational level but not at the mRNA level, while irritants that promote erythema induced p53 mRNA expression [46-47]. These observations indicate that USF1 may act through more than one route to increase p53 levels according to cell type. In skin and in response to UV-induced DNA damage USF1 controls the p53 protein stability. This is expected to be of significant impact, since one attractive strategy for

cancer therapy is based on p53 reactivation in cancers encoding normal but inactivated p53 protein, as observed frequently in melanomas [48-49-50].

Our evidence that USF1 stabilizes the p53 protein suggests that it may have functions independent of its well-defined role as a transcriptional regulator. Indeed, USF1 regulates gene expression through binding E-box regulatory elements in the promoters of target genes or by acting as a docking platform to recruit chromatin-modifying enzymes such as CBP/p300, PCAF, Set7/9, HDAC9 [51-52-53-54-55]. We now demonstrate that USF1 physically associates with the p53 complex thereby retaining it in the nucleus. The ability of USF1 to promote p53 function appears to be independent from its ability to bind DNA. We cannot however exclude the possibility that the interaction between these two transcription factors may be important to bring p53 in the vicinity of p53 DNA-responsive element. Together this provides new prospects in how USF1 and p53 may regulate the expression of common target genes. In addition, it tells that USF1 can function through a new and unexpected mechanism to control cellular processes, broadening the role of USF1 and of members of the b-HLH-LZ transcription factors family.

Here we demonstrate that, in response to stress, USF1 associates with p53 to ensure p53 function. USF1 thereby prevents MDM2-mediated ubiquitination and subsequent cytoplasmic degradation of p53. This mechanism relies on a mutually exclusive association of USF1 and MDM2 with the p53 protein. Other stress-inducible transcription factors have been reported to contribute to the regulation of p53. For example, the transcription factor YY1 [56] enhances MDM2-mediated ubiquitination of p53 while ATF3 [57] prevents p53 ubiquitination and TAFII31 [58] prevents MDM2 association with p53. Although these transcription factors share a common role with USF1 in mediating p53 stability, the function of USF1 is not redundant since loss of USF, on its own, impedes p53 stabilization. The importance of USF1 in regulating p53 function may first be attributed to their hierarchical relation. *Trp53* KD cells express normal levels of USF1 but they are not able to direct cell cycle arrest as observed for *Usf1* KD cells. Similarly, overexpression of USF1 in p53-null Saos2-cells is not able to mimic the effect of p53 on cell proliferation, while USF1 will promote p53 function in p53 expressing cells [59]. USF1 is thus proposed to operate as an upstream regulator of p53 stability and function. Second, the abundance of USF1 may also support its critical role in directing p53 function. Indeed, while USF1 is constitutively expressed, ATF3 and YY1 mediated p53-interaction

requires their induction in response to genotoxic stress [56-57]. This suggests that USF1 is an immediate actor for p53 stabilization in response to genotoxic stress. This however does not exclude that these transcription factors could act sequentially. Why and how the association of one factor with p53 is favored over another remains however to be elucidated and remains an open question. One possibility could be that the nature and intensity of the DNA damage regulate this to influence p53-directed cell fate [13-60].

To date, no association has been reported between mutations in the *USF1* coding sequence and skin cancer or any other cancers [61-62-63]. However, SNPs affecting USF1 binding to the *Pten* promoter have been found to be associated with Cowden syndrome [64] and the loss of USF1 transcriptional activity has been described in several breast cancer cell lines [65]. Furthermore, the activation of the *hTERT* gene in oral tumors is associated with the decreased expression of USF1 and USF2 [66]. These cancers are associated with exposure to environmental carcinogens, including tobacco smoke and sunlight, both of which promote DNA hypermethylation [67]. It is, however, unclear whether epigenetic modifications of *USF1* in response to environmental insults are involved in tumorigenesis. Interestingly, oncogenic transformation by *Helicobacter pylori* infection is associated with the methylation of the *USF1* promoter and subsequent inhibition of USF1 protein production [68]. In addition, *Helicobacter pylori* infection has been also shown to impair p53 protein stability [69]. It remains to be determined whether this mechanism of stress-induced epigenetic transformation contributes to silencing of USF1 impairing p53 stability and whether it is a new mechanism of how p53 loss of function may occur in cancer cell.

In this work we demonstrate that USF1 is a critical stress sensor required to direct appropriate p53-dependent cell fate decision. USF1 operates through a new and unexpected function broadening bHLH-LZ functions. Finally, our findings suggest that the loss of USF1 expression should be considered as a potential initiator of tumorigenesis in environmental insults context.

Materials and Methods:

Mouse skin irradiation

Usf1^{-/-} (KO) and *Usf1*^{+/+} (WT) mice were kindly provided by Sophie Vaulont (Cochin Institute) [70]. Animals 8-12 weeks old were used for UV irradiation experiments. Mice were maintained under specific pathogen-free (SPF) conditions in our accredited animal facilities (A 35 – 238 – 40). For *in vivo* irradiation, the backs of the mice were shaved, and one area was protected (non-exposed control) and another irradiated (exposed area). For *ex vivo* analysis, skin biopsies (0.8 cm diameter) were recovered from the back of WT and *Usf1*^{-/-} mice and maintained in culture as previously described (Baron Y. et al., 2012). Skins were pulsed with UVB (312 nm, 5 kJ/m²) using the Stratalinker apparatus (Stratagene).

Ethics Statement

The present animal study follows the 3R legislation (Replace-Reduce-Refine). It has been declared and approved by the French Government Board (N°5347). Animal welfare is a constant priority: animals were thus sacrificed under anesthesia.

Cell culture, small hairpin (sh) RNA transductions, and inhibitor treatments

Mice primary fibroblasts were isolated by collagenase dissociation of skin dermis from *Usf1*^{-/-} and *Usf1*^{+/+} mice [71]. Cells were cultured in DMEM (Invitrogen) medium containing 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere for one week before the irradiation protocol. Cells were then irradiated with 0.6 kJ/m² UVB and harvested at the indicated time points.

B16 melanoma cells were transduced with lentiviral particles containing a vector carrying an shRNA (Sigma) targeting the murine *Usf1* mRNA (sh-*Usf1* SHCLNV-NM_009480 clone TRCN0000302005) or the *Trp53* mRNA (sh-*Trp53*; SHCLNV-NM_011640 clone TRCN000030210844), or carrying scrambled sh RNA (sh-CT (SHC002V). After infection, cells were maintained under selection in the presence of puromycin (Invitrogen). Cells were then routinely cultured in RPMI (Invitrogen) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin at 37°C under a 10% CO₂ atmosphere. Cell were irradiated with 0.3 kJ/m² UVB and harvested at the indicated time points. For MG132 assays, cells were treated with 10 μM Z-Leu-Leu-al (Sigma) in RPMI

(Invitrogen) medium. For cycloheximide (CHX) treatment, after 3h of MG132 treatment the culture medium was removed and replaced by medium containing 20 μ M CHX (Sigma). For nutlin3 treatments, cells were stimulated with 10 μ M of nutlin3 (Santa cruz).

Cell cycle synchronization, cell viability and BrdU incorporation analysis

B16 melanoma cells were synchronized in G1/S phase following a double thymidine/aphidicolin block (16h with 2 mM thymidine, released for 9 hours and then 16h with 5 μ g/ml aphidicolin).

Cell viability following exposure to UV was measured using MTT test as previously described [21].

BrdU analysis was carried using an *in situ* BrdU detection kit (BD Biosciences): as recommended by the manufacturer. Positively stained cells (BrdU positives) and total cells (hematoxylin stained) in 10 randomly selected microscopic fields (x100) were counted for each condition.

Gene expression analysis

RNA extraction and RT-PCRq were as previously described [21]. Relative amounts of transcripts were determined using the delta Ct method. Data were normalized to the values for the *HPRT* transcript. Forward (F) and reverse (R) primers were designed using the Universal Probe Library Assay Design Center (Roche) and their efficiency has been confirmed (Sequences available on request).

Western blotting and immunoprecipitation

Mouse skin proteins were extracted by pottering 8 mm diameter skin biopsies in liquid nitrogen; the resulting powders were lysed in a lysis buffer containing 10 mM EDTA, 50 mM pH 8 Tris-HCl, 0.5% Empigen BB, 1% SDS, 25 mM NaF, 1 mM orthovanadate, 25 mM beta-glycerophosphate, and 1x protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Cell culture protein lysates were obtained by scraping off cells in NP40 lysis buffer: 20 mM Tris pH7.5, 100 mM NaCl, 20 mM β -glycerophosphate, 5 mM $MgCl_2$, 0.2% NP-40, 10% glycerol, 1 mM NaF, 0.5 mM DTT, 1x protease inhibitor cocktail. Equal amounts of protein (30 μ g), quantified using the BCA protein assay (Sigma) were denaturated in Laemmli buffer for 5 min at 95°C and resolved by 15% SDS-PAGE. Membranes were probed with

appropriate antibodies and signals detected using the LAS-3000 Imaging System (Fujifilm) were quantified with ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The following primary antibody were used: anti-USF1 (C:20), anti-HSC70 (B-6), anti-MDM2 (SMP14), anti-GFP (Santa Cruz), anti-CPD (TDM2) (MBL), anti-p53 (1C12), anti-phospho H2AX Ser139 (Cell Signaling), anti-total histone H2AX, anti-p21 (Abcam), and anti-MDM2 (3G9) (Millipore) and anti-Ubiquitin (Dako).

Co-immuno-precipitation experiments were performed using 1 mg of protein with 2 μ g of Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) as negative control or with 2 μ g of USF1 antibodies (C:20) or MDM2 antibodies (SMP14 and 3G9) and incubated overnight at 4°C. Flag-tag proteins were immunoprecipitated using the flag immunoprecipitation kit (Sigma). Immunocomplexes were isolated using Protein A-G sepharose beads.

Luciferase activity and transitory transfections

To analyze the transcriptional activity of p53, B16 melanoma cells in 10 cm-diameter dishes were transiently transfected with 5 μ g of pG13-Luc (carrying a p53-responsive element; [72]) alone or in combination with 6 μ g of pCMV GFP (encoding the GFP) or pCMV-USF1 (WT, T153E, T153A, AUSF (negative dominant; [15]), or pCAG3.1 (encoding p53; [73]) and incubated for 24h. Cells were then passaged in 12-well plates and irradiated 24h post passage (a total of 48h post transfection). Luciferase analysis was conducted using the DUAL-Luciferase reporter assay kit according to the manufacturer's recommendations (Promega).

To study p53 degradation in the presence of MDM2 B16 melanoma cells in 6-well plates were transfected with 1 μ g of a plasmid encoding flag-tagged p53 protein (Flag-p53/pRK5; Addgen, Plasmid 39237) alone or in combination with 2 μ g of a plasmid encoding the MDM2 protein (pCMV-myc3-HDM2; Addgen, Plasmid 20935). For p53 stabilization rescue analysis in sh-*Usf1* KD cells, cells were co-transfected with 2 μ g of plasmid encoding GFP protein or USF1 wild type protein [15], together with 1 μ g of Flag-p53/pRK5 plus 2 mg of pCMV-myc3-HDM2. The amount of plasmid DNA used for transfection was adjusted with empty pCMV plasmid to be equal in every case.

CPD quantification by ELISA

CPD in skin tissues was assayed by ELISA, according to Cosmo bio recommendations (Cosmo Bio Co., LTD., Japan). DNA was purified with Nucleospin tissue extraction kits (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Briefly, 200 ng aliquots of denatured DNA were distributed into 96-well plates precoated with protamine sulfate (Polyvinylchloride flat-bottom). DNA lesions were detected with specific mouse anti-CPD antibodies [21], and bound antibody was revealed with a biotin/peroxidase-streptavidin system. The absorbance at 492 nm was used for quantitative measurements.

Immuno-histochemistry and imunofluorescence staining

Skin biopsies were fixed in formalin (4%) and embedded in paraffin. Paraffin-embedded tissue was cut into 4 µm-thick slices, mounted on slides and dried at 58°C for 60 minutes. A Discovery Automated IHC stainer and the Ventana DABMap detection kit (Ventana Medical Systems) were used for immunohistochemical staining. For DAB, detection slides were incubated with rabbit monoclonal anti-CPD antibody (TDM, MBL) and bound antibody was revealed with biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (Vector laboratory, USA). Slides were then counterstained for 4 minutes with hematoxylin and rinsed. For fluorescence analysis, slides were incubated with rabbit monoclonal Ki-67 (SP6, bioscience leasanton CA) and bound antibody was detected with secondary anti-rabbit FITC-conjugated antibody. Slides were coverslipped in aqueous mounting medium containing DAPI. The numbers of Ki-67-positive cells were evaluated by counting the percentage of interfollicular-positive cells (Ki-67 among Dapi-stained cells) in 10 different microscope fields (x40) per skin section.

For cyto-immunofluorescence staining, cells grown on coverslip chambers were fixed with formalin (4%) for 20 min, washed with PBS, quenched with 50 mM NH₄Cl for 20 min and washed once with PBS. The cells were permeabilized with 0.1% Triton and saturated with 1% PBS/BSA; 15min later, the primary antibody was added. Bound antibody was revealed with anti-rabbit Alexa 488 or anti-mouse FITC 588 secondary antibodies (Jackson).

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the University of Rennes and the CNRS for their support and the Cancer charity care with the "Comités Grand Ouest de la Ligue

contre le Cancer” for their fundings. We would also like to thanks the “LNCC-CD22” with the “Conseil General de Bretagne” for funding Amine Bouafia during his PhD. We thank the Biosit Core Facilities, and in particular the Animal Housing ARCHE, the Histopatology H2P2 and the Imaging Mric departments. The authors would like to also acknowledge the members of the Galibert Lab and the IGDR as well as Christian Jaulin and Rémy Pedeux for useful discussions and advices.

References:

1. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
2. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, et al. (2013) Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499: 214-218.
3. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73: 39-85.
4. Oren M (2003) Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10: 431-442.
5. Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JL, Beach D, Jacks T, et al. (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377: 552-557.
6. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P (1995) Mice lacking p21^{CIP1}/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82: 675-684.
7. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816.
8. Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, Wu X, Ronai Z (1998) Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene* 17: 2543-2547.
9. Kruse JP, Gu W (2009) Modes of p53 regulation. *Cell* 137: 609-622.
10. Meek DW, Anderson CW (2009) Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a000950.
11. Gomez-Lazaro M, Fernandez-Gomez FJ, Jordan J (2004) p53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *J Physiol Biochem* 60: 287-307.
12. Olsson A, Manzl C, Strasser A, Villunger A (2007) How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? *Cell Death Differ* 14: 1561-1575.
13. Pietsenpol JA, Stewart ZA (2002) Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181-182: 475-481.
14. Corre S, Primot A, Baron Y, Le Seyec J, Goding C, et al. (2009) Target gene specificity

of USF-1 is directed via p38-mediated phosphorylation-dependent acetylation. *J Biol Chem* 284: 18851-18862.

15. Corre S, Primot A, Sviderskaya E, Bennett DC, Vaulont S, et al. (2004) UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J Biol Chem* 279: 51226-51233.
16. Galibert MD, Carreira S, Goding CR (2001) The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *EMBO J* 20: 5022-5031.
17. Ikehata H, Ono T (2011) The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res* 52: 115-125.
18. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL (2010) Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol* 49: 978-986.
19. Ravanat JL, Douki T, Cadet J (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B* 63: 88-102.
20. Zaidi MR, Day CP, Merlino G (2008) From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol* 128: 2381-2391.
21. Baron Y, Corre S, Mouchet N, Vaulont S, Prince S, et al. (2012) USF-1 is critical for maintaining genome integrity in response to UV-induced DNA photolesions. *PLoS Genet* 8: e1002470.
22. Reisman D, Rotter V (1993) The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 tumor suppressor gene. *Nucleic Acids Res* 21: 345-350.
23. Campbell C, Quinn AG, Angus B, Farr PM, Rees JL (1993) Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. *Cancer Res* 53: 2697-2699.
24. Auclair Y, Rouget R, Affar el B, Drobetsky EA (2008) ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17896-17901.
25. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, et al. (2008) GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 957-967.
26. Jimenez GS, Nister M, Stommel JM, Beeche M, Barcarse EA, et al. (2000) A

- transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function. *Nat Genet* 26: 37-43.
27. Li G, Mitchell DL, Ho VC, Reed JC, Tron VA (1996) Decreased DNA repair but normal apoptosis in ultraviolet-irradiated skin of p53-transgenic mice. *Am J Pathol* 148: 1113-1123.
 28. McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA (1993) Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* 22: 355-360.
 29. Ferreón JC, Lee CW, Arai M, Martínez-Yamout MA, Dyson HJ, et al. (2009) Cooperative regulation of p53 by modulation of ternary complex formation with CBP/p300 and MDM2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6591-6596.
 30. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91: 325-334.
 31. Tao W, Levine AJ (1999) P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6937-6941.
 32. Nakanishi M, Niida H, Murakami H, Shimada M (2009) DNA damage responses in skin biology--implications in tumor prevention and aging acceleration. *J Dermatol Sci* 56: 76-81.
 33. Jung HS, Kim KS, Chung YJ, Chung HK, Min YK, et al. (2007) USF inhibits cell proliferation through delay in G2/M phase in FRTL-5 cells. *Endocr J* 54: 275-285.
 34. Loayza-Puch F, Drost J, Rooijers K, Lopes R, Elkon R, et al. (2013) p53 induces transcriptional and translational programs to suppress cell proliferation and growth. *Genome Biol* 14: R32.
 35. Luo X, Sawadogo M (1996) Antiproliferative properties of the USF family of helix-loop-helix transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1308-1313.
 36. Davis PL, Miron A, Andersen LM, Iglehart JD, Marks JR (1999) Isolation and initial characterization of the BRCA2 promoter. *Oncogene* 18: 6000-6012.
 37. Goueli BS, Janknecht R (2003) Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor. *Oncogene* 22: 8042-8047.
 38. Jaiswal AS, Narayan S (2001) Upstream stimulating factor-1 (USF1) and USF2 bind to and activate the promoter of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene. *J Cell Biochem* 81: 262-277.

39. Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, et al. (2000) Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res* 6: 1239-1247.
40. Wu K, Jiang SW, Couch FJ (2003) p53 mediates repression of the BRCA2 promoter and down-regulation of BRCA2 mRNA and protein levels in response to DNA damage. *J Biol Chem* 278: 15652-15660.
41. Hale TK, Braithwaite AW (1995) Identification of an upstream region of the mouse p53 promoter critical for transcriptional expression. *Nucleic Acids Res* 23: 663-669.
42. Ikehata H, Okuyama R, Ogawa E, Nakamura S, Usami A, et al. (2010) Influences of p53 deficiency on the apoptotic response, DNA damage removal and mutagenesis in UVB-exposed mouse skin. *Mutagenesis* 25: 397-405.
43. Huang LC, Clarkin KC, Wahl GM (1996) Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4827-4832.
44. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7491-7495.
45. Saldana-Meyer R, Recillas-Targa F (2011) Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Epigenetics* 6: 1068-1077.
46. Healy E, Reynolds NJ, Smith MD, Campbell C, Farr PM, et al. (1994) Dissociation of erythema and p53 protein expression in human skin following UVB irradiation, and induction of p53 protein and mRNA following application of skin irritants. *J Invest Dermatol* 103: 493-499.
47. Liu M, Dhanwada KR, Birt DF, Hecht S, Pelling JC (1994) Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis* 15: 1089-1092.
48. Gembarska A, Luciani F, Fedele C, Russell EA, Dewaele M, et al. (2012) MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med* 18.
49. Ji Z, Kumar R, Taylor M, Rajadurai A, Marzuka-Alcala A, et al. (2013) Vemurafenib Synergizes with Nutlin-3 to Deplete Survivin and Suppress Melanoma Viability and Tumor Growth. *Clin Cancer Res*.
50. Lu M, Breyssens H, Salter V, Zhong S, Hu Y, et al. (2013) Restoring p53 function in

human melanoma cells by inhibiting MDM2 and cyclin B1/CDK1-phosphorylated nuclear iASPP. *Cancer Cell* 23: 618-633.

51. Chatterjee TK, Idelman G, Blanco V, Blomkalns AL, Piegore MG, Jr., et al. (2011) Histone deacetylase 9 is a negative regulator of adipogenic differentiation. *J Biol Chem* 286: 27836-27847.
52. Crusselle-Davis VJ, Vieira KF, Zhou Z, Anantharaman A, Bungert J (2006) Antagonistic regulation of beta-globin gene expression by helix-loop-helix proteins USF and TFII-I. *Mol Cell Biol* 26: 6832-6843.
53. Huang S, Li X, Yusufzai TM, Qiu Y, Felsenfeld G (2007) USF1 recruits histone modification complexes and is critical for maintenance of a chromatin barrier. *Mol Cell Biol* 27: 7991-8002.
54. Wang Y, Wong RH, Tang T, Hudak CS, Yang D, et al. (2013) Phosphorylation and recruitment of BAF60c in chromatin remodeling for lipogenesis in response to insulin. *Mol Cell* 49: 283-297.
55. Wong RH, Chang I, Hudak CS, Hyun S, Kwan HY, et al. (2009) A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin. *Cell* 136: 1056-1072.
56. Sui G, Affar el B, Shi Y, Brignone C, Wall NR, et al. (2004) Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell* 117: 859-872.
57. Yan C, Lu D, Hai T, Boyd DD (2005) Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *EMBO J* 24: 2425-2435.
58. Buschmann T, Lin Y, Aithmitti N, Fuchs SY, Lu H, et al. (2001) Stabilization and activation of p53 by the coactivator protein TAFII31. *J Biol Chem* 276: 13852-13857.
59. Qyang Y, Luo X, Lu T, Ismail PM, Krylov D, et al. (1999) Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 19: 1508-1517.
60. Chang D, Chen F, Zhang F, McKay BC, Ljungman M (1999) Dose-dependent effects of DNA-damaging agents on p53-mediated cell cycle arrest. *Cell Growth Differ* 10: 155-162.
61. Cleary SP, Jeck WR, Zhao X, Kuichen, Selitsky SR, et al. (2013) Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing. *Hepatology*.
62. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, et al. (2012) Exome

- sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 44: 1006-1014.
63. Morin RD, Mungall K, Pleasance E, Mungall AJ, Goya R, et al. (2013) Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole genome sequencing. *Blood*.
64. Pezzolesi MG, Zbuk KM, Waite KA, Eng C (2007) Comparative genomic and functional analyses reveal a novel cis-acting PTEN regulatory element as a highly conserved functional E-box motif deleted in Cowden syndrome. *Hum Mol Genet* 16: 1058-1071.
65. Ismail PM, Lu T, Sawadogo M (1999) Loss of USF transcriptional activity in breast cancer cell lines. *Oncogene* 18: 5582-5591.
66. Chang JT, Yang HT, Wang TC, Cheng AJ (2005) Upstream stimulatory factor (USF) as a transcriptional suppressor of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in oral cancer cells. *Mol Carcinog* 44: 183-192.
67. Zeilinger S, Kuhnel B, Klopp N, Baurecht H, Kleinschmidt A, et al. (2013) Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS One* 8: e63812.
68. Bussiere FI, Michel V, Memet S, Ave P, Vivas JR, et al. (2010) H. pylori-induced promoter hypermethylation downregulates USF1 and USF2 transcription factor gene expression. *Cell Microbiol* 12: 1124-1133.
69. Wei J, Nagy TA, Vilgelm A, Zaika E, Ogden SR, et al. (2010) Regulation of p53 tumor suppressor by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 139: 1333-1343.
70. Vallet VS, Casado M, Henrion AA, Bucchini D, Raymondjean M, et al. (1998) Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose. *J Biol Chem* 273: 20175-20179.
71. Lichti U, Anders J, Yuspa SH (2008) Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. *Nat Protoc* 3: 799-810.
72. Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, et al. (1992) Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 256: 827-

830.

73. Saito S, Goodarzi AA, Higashimoto Y, Noda Y, Lees-Miller SP, et al. (2002) ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. J Biol Chem 277: 12491-12494.

Figure legends:

Figure 1: *Usf1* KO mice present defective induction of p53 protein

The back of *Usf1* KO mice (*Usf1*^{-/-}) and WT mice (*Usf1*^{+/+}) were irradiated or not irradiated with UVB (5 kJ/m²) and the skin was analyzed 5h later. **(A)** RT-qPCR analysis of *Trp53* and *Usf1* mRNA relative level (expressed as a ratio to the value for the *Hprt* transcript) in skin extracts from protected (-) and UV-exposed (+) areas. Error bars: SD, n>9. **(B)** Western blot showing USF1, p53, γH2AX and HSC70 (loading control) immunoreactivity in skin irradiated or not irradiated with UVB. The graph reports the mean ratio between the p53 signal (normalized to that for HSC70) in skin-exposed areas versus non-irradiated areas (controls). Error bars: SD, n=8 for each condition. **(C)** Immunohistochemical labeling of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) showing their localization and abundance in skin areas (x100) exposed or not exposed to UVB. Dashed lines indicate the boundary between the dermis (d) and the epidermis (e), and arrows indicate positive nuclei. **(D)** The level of CPDs in total DNA extracts from skin was quantified by ELISA. The graph shows the mean difference in the CPD absorbance values between for exposed and protected skin areas. Error bars: SD, n=4. **(E)** Immunofluorescence staining with the Ki-67 antibody of inter-follicular cycling cells in skin areas (x100) exposed or not exposed to UVB. **(F)** The graph shows the mean percentage of cycling cells (calculated as Ki-67-positive cells/total Dapi-stained cells) in protected and UV-exposed skin areas. Error bars: SD, n=3. Student's *t* test was used to test the significance of differences (*, *p* < 0.05, **, *p* < 0.01, ***, *p* < 0.001).

Figure 2: USF1 mediates p53-dependent cell cycle arrest

B16 melanoma cells knocked down for *Usf1* (sh-*Usf1*) or p53 (sh-*Trp53*) and control cells (sh-*CT*) were synchronized in G1/early S phase. The cells were then irradiated or not irradiated with UVB (0.3 kJ/m²) and the cell cycle released. **(A)** *Trp53*, *Usf-1* and *p21* mRNAs in cells irradiated (+) or not irradiated (-) with UVB were quantified by RT-qPCR 3 hours after the release of the cell cycle; results are reported relative to the values for the *Hprt* transcript. Error bars: SD, n=3. **(B)** Western blot analysis of USF1, p53, p21 and HSC70 (loading control) in protein extracts from cells treated as in A. **(C)** BrdU incorporation assay in cells irradiated or not irradiated with UVB. The values plotted are

mean percentages of BrdU incorporating cells after UVB irradiation compared to those for non-irradiated cells. Error bars: SD, n=3. **(D)** Stripchart plot showing the volume of tumors formed 12 days after subcutaneous injections of $2 \cdot 10^4$ B16 melanoma cells (sh-*Usf1*, sh-*Trp53* or sh-*CT*). UVB (0.3 kJ/m^2)-irradiated or control cells were injected into the two sides of the back of NOD/SCID mice. Error bars: SD, n=4 for mice injected with sh-*CT* and sh-*Trp53*, and n=5 for mice injected with sh-*Usf1* cells. Student's t test was used for statistical analysis (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

Figure 3: *Usf1* is required to stabilize p53 protein following genotoxic stress

B16 melanoma cells knocked down for *Usf1* (sh-*Usf1*) and their controls (sh-*CT*) were analyzed for post-translational regulation of p53. **(A)** Western blot analysis of the effect of USF1 re-expression on p53 protein levels in sh-*Usf1* cells irradiated or not irradiated with UVB and tested 6h after irradiation. Cells were transfected with the cDNA indicated (as described in the materials and methods) and analyzed for USF1, p53 and HSC70 (loading control). **(B)** Western blot showing USF-1, p53 and HSC70 immunoreactivity in sh-*CT* and sh-*Usf1* cells at the indicated time following treatment with MG132 ($10 \mu\text{M}$). **(C-D)** Time course of p53 accumulation and Ser15-phosphorylation in sh-*CT* and sh-*Usf1* cells treated with vehicle (DMSO) in C or MG132 ($10 \mu\text{M}$) plus UVB (0.3 kJ/m^2) irradiation in D. **(E-F)** p53 degradation in sh-*CT* and sh-*Usf1* cells pretreated for 3h with MG132 ($10 \mu\text{M}$) and then with cycloheximide (CHX $20 \mu\text{M}$). Cells were (F) or were not (E) irradiated (0.3 kJ/m^2) with UVB previous CHX addition and analyzed at the time points indicated. The graphs show the results of densitometric analysis of p53 immunoreactive bands (normalized to the loading controls H2AX or HSC70). **(G)** Western blot showing flag-tagged p53 and GFP proteins in sh-*CT* or sh-*Usf1* cells after co-transfection of the corresponding cDNA. **(H)** Immunoprecipitation analysis to assay ubiquitinated flag-tagged p53 after transfection of sh-*CT* or sh-*Usf1* with the corresponding cDNA. Cells were treated with MG132, were or were not irradiated with UVB and analyzed 3 hours later. The values reported indicate the level of p53 ubiquitination (normalized to the total amount of flag-tagged protein recovered).

Figure 4: USF1 associates with p53 upon cellular stress and counteracts MDM2-mediated p53 degradation

p53 protein-protein interactions and MDM2 mediated p53 degradation were studied in B16 melanoma cells knocked down for *Usf1* (sh-*Usf1*) and their controls (sh-*CT*). **(A-B)** sh-*CT* and sh-*Usf1* cells were treated with 10 μ M MG132 for 3 hours then irradiated or not irradiated with UVB. Western blot analysis of proteins immunoprecipitated from cell lysates **(A)** with USF1 antibody and blotted with p53 (1C12) and USF1 antibodies, and **(B)** with a mix of two MDM2 antibodies (SMP14 and 3G9) and blotted with p53 antibody (1C12). **(C)** Western blot analysis showing basal levels of USF1, MDM2 and HSC70 (loading control) in sh-*CT* and sh-*Usf1* cell lysates. **(D)** Western blot showing the effect of nutlin3 (10 μ M, 6h) treatment on the levels of flag-tagged p53 and GFP proteins in sh-*CT* and sh-*Usf1* cells; antibodies to USF1, p53, GFP and HSC70 (loading control) were used. **(E)** Western blot analysis of p53, MDM2 and HSC70 (loading control) in sh-*CT* and sh-*Usf1* cells over-expressing either p53 or p53 plus MDM2. **(E)** Same experiment as in D but in sh-*Usf1* KD cells over-expressing either GFP or USF1. **(F)** Immunofluorescence analysis of p53 expression and localization in sh-*Usf1* KD cells treated as in D and stimulated with vehicle (DMSO) or Nutlin-3 (10 μ M) for 6 hours.

Figure 5: Model of regulation of p53 stabilization by USF1 in response to stress

USF1 prevents MDM2-mediated p53 degradation under stress conditions, thereby ensuring the stability and tumor suppressor activity of the p53 protein. In the absence of DNA damage, p53 is targeted to proteasomal degradation after binding to MDM2, maintaining cell proliferation. Under a DNA-damage context, USF1 counteracts MDM2 function by interacting with p53 thereby increasing its transcriptional activity to control transient cell cycle arrest and DNA repair processes. In the absence of USF1, p53 stabilization is abolished abrogating cell cycle control in response to DNA damage and thereby favoring genomic instability.

Supplemental:

Figure S1: *Usf1* KO reduces induction of p53 target genes in response to genotoxic agent

Usf-1^{+/+} (Usf-1 WT) and *Usf-1^{-/-}* (Usf-1 KO) skins were or were not irradiated with UVB (5 kJ/m²) and analyzed for the induction of transcripts *in vivo* and *ex vivo*. **(A-B)** RT-qPCR analysis of *CDKN1a* (p21), *SFN* (14-3-3 σ) and *PCNA* transcripts in UVB-irradiated

skin and non-exposed controls; values reported were normalized to those for the *Hprt* transcript. Transcripts were assayed *in vivo* 5 hours after irradiation in A or *ex vivo* 3 hours after irradiation in B. Error bars: SD, n=4 *in vivo* and n=3 *ex vivo*.

Figure S2: USF1 is required to promote p53 activity

B16 melanoma cells knocked down for *Usf1* were tested for their ability to modulate p53 level and specific activity in response to UVB irradiation (6h after 0.3 kJ/m²). **(A)** Western blot analysis of p53, p21 and HSC70 (loading control) proteins in sh-*CT*, sh-*Usf1* and sh-*Trp53* cells following UVB irradiation. **(B)** p53 transcriptional activity in sh-*CT*, sh-*Usf1* and sh-*Trp53* cells transfected with a reporter plasmid encoding a p53 responsive element (p53-RE) driving the luciferase gene and irradiated or not irradiated with UVB. The graph reports luciferase activity following UVB irradiation with the values for non-irradiated sh-*CT* cells used for reference. Error bars: SD, n=3. **(C)** Same experiment as in B but with sh-*Usf1* KD cells co-transfected with a reporter plasmid encoding a p53 responsive element together with GFP or different USF1 cDNA constructs. Schematic representation of the USF1 protein and various point and deletion mutations modulating USF1 transcriptional activity: positively (T153E) or negatively (T153A, AUSF). Error bars: SD, n=3.

Figure S3: USF1 KO fibroblasts override S phase arrest following genotoxic stress.

Primary fibroblasts isolated from *Usf-1*^{+/+} and *Usf-1*^{-/-} mice were analyzed for S phase progression, and regulation of p53 and p21 following UVB irradiation (0.6 kJ/m²). **(A)** Graph reporting the mean percentage of primary fibroblasts incorporating BrdU after irradiation (0.6 kJ/m²); values for non-irradiated controls are given for reference. Error bars: SD, n=3. **(B)** MTT activity evaluation of primary fibroblast viability after UVB irradiation compared to non-irradiated controls treated as in A. Error bars: SD, n=3. **(C)** Western blot analysis of p53 and p21 in primary fibroblasts 6 hours after UVB irradiation. The graph represents the densitometric evaluation of p21 and p53 bands (normalized to those for HSC70). Error bars: SD, n=3.

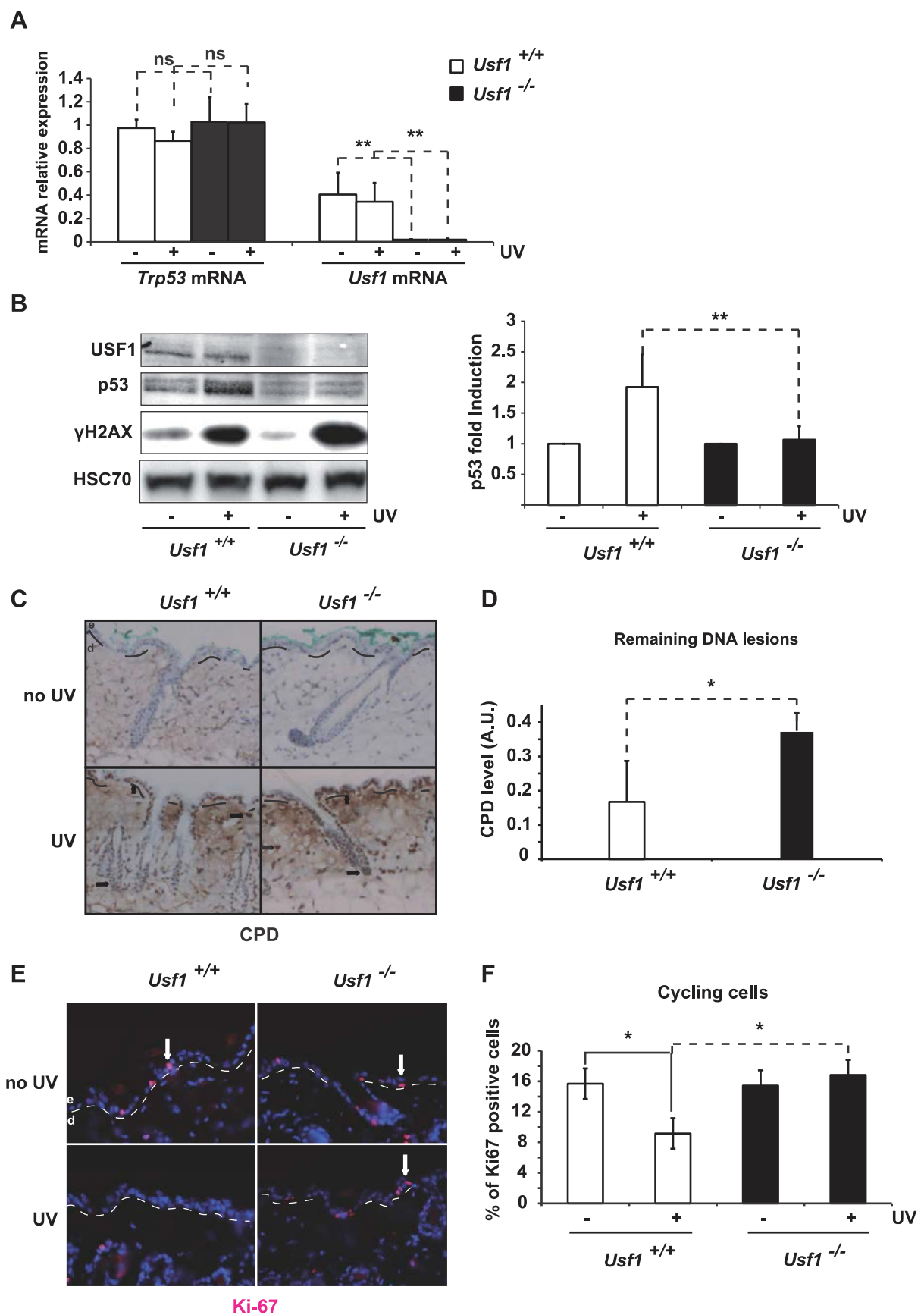
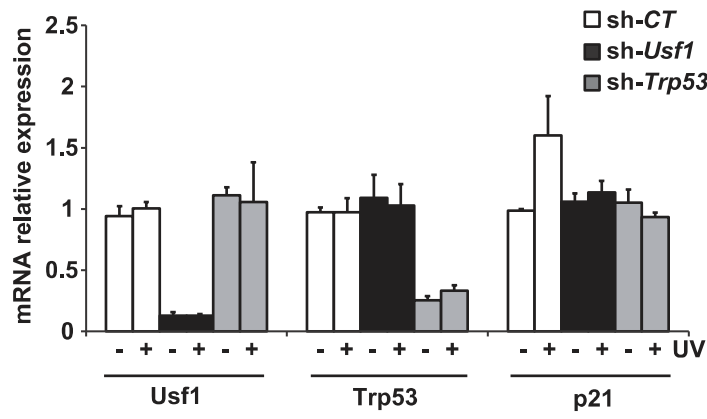
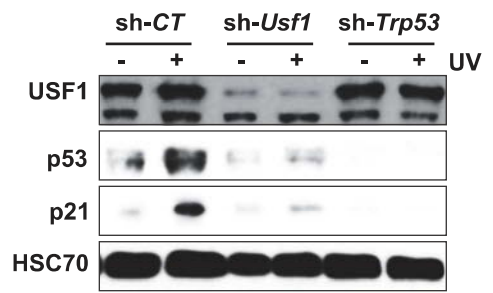
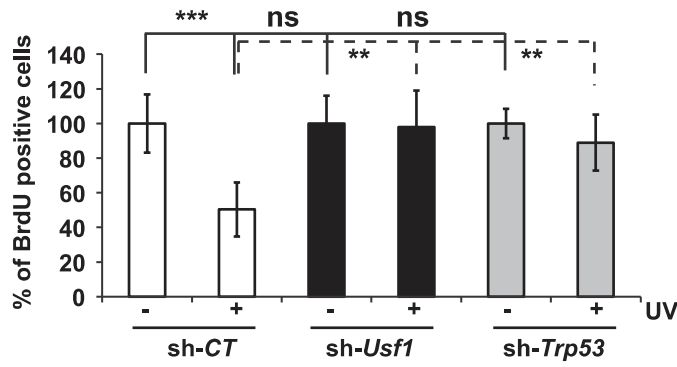
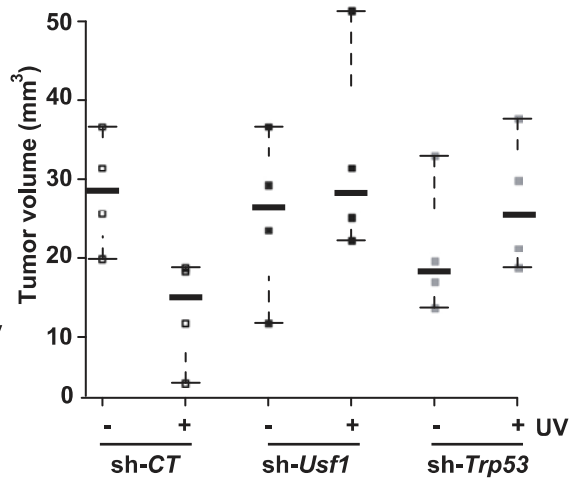


Figure 1

A**B****C****D****Figure 2**

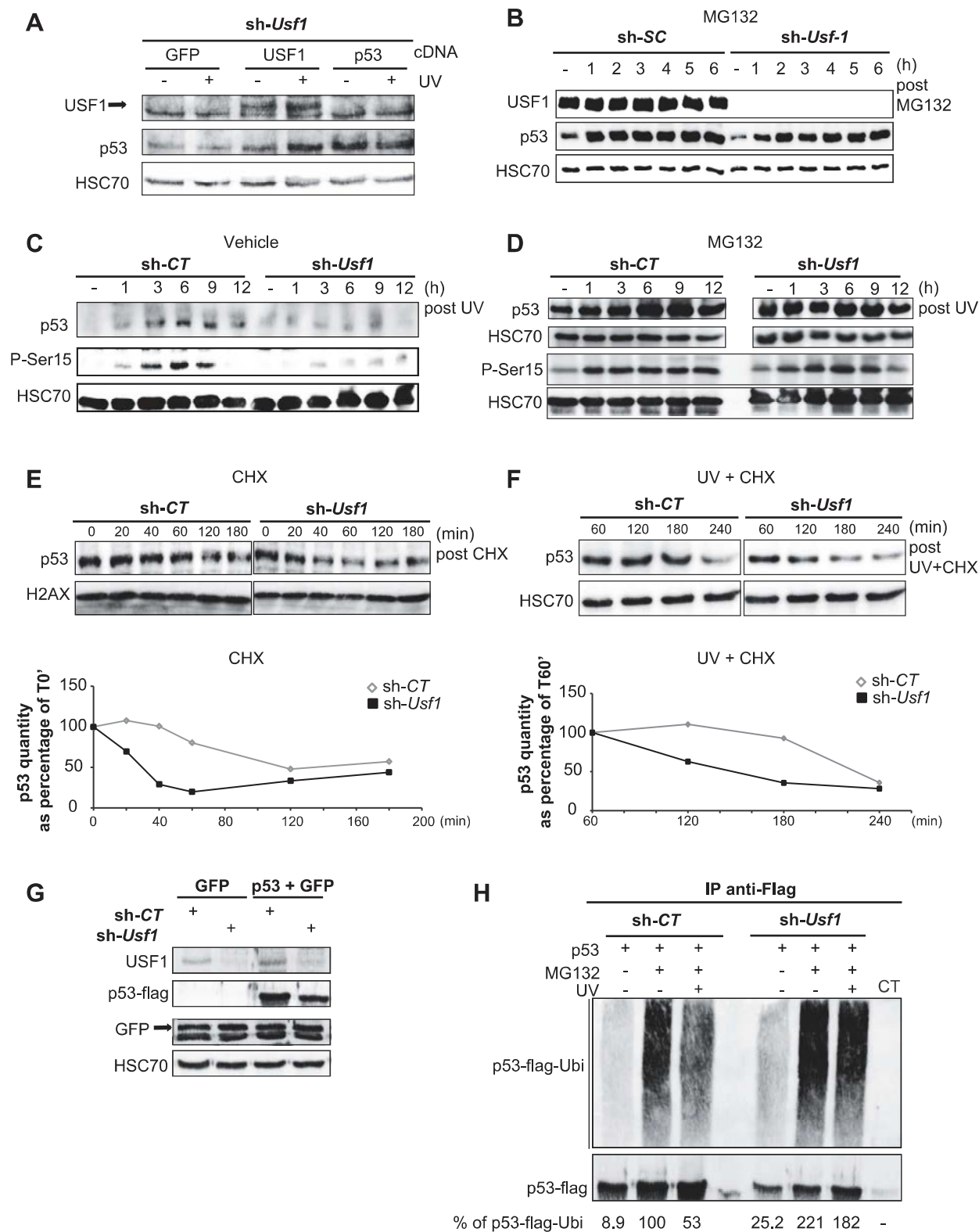


Figure 3

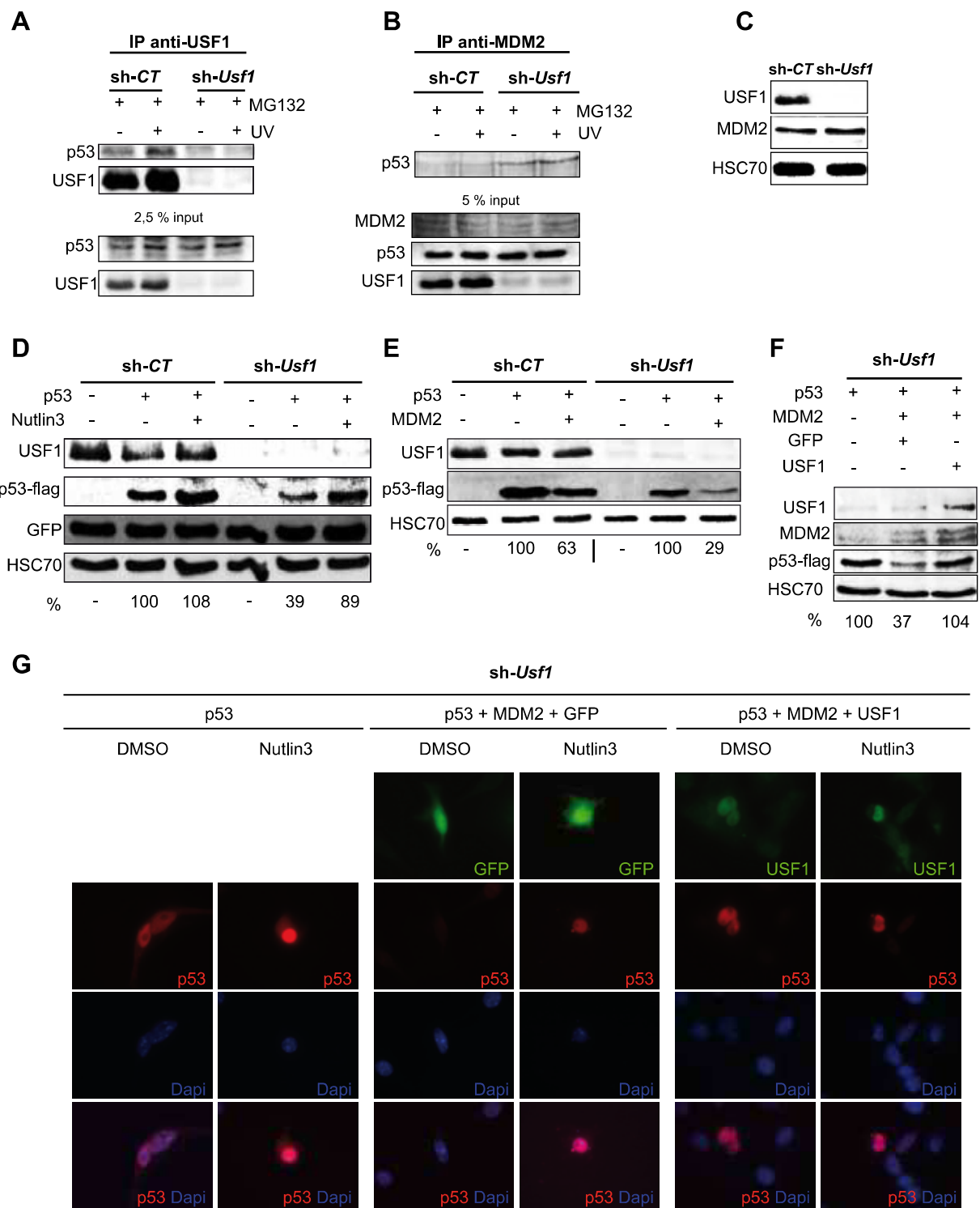


Figure 4

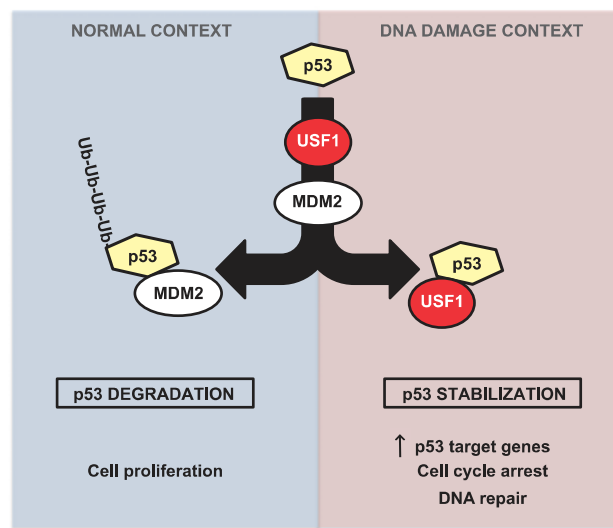
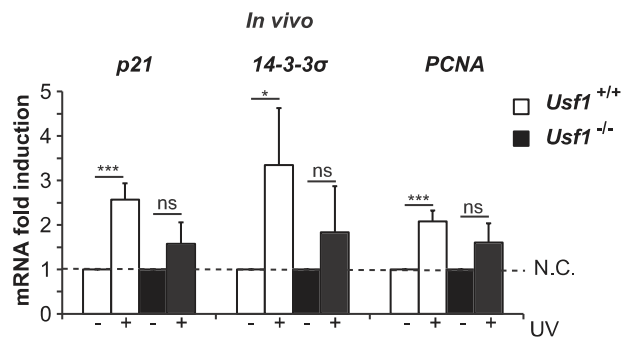
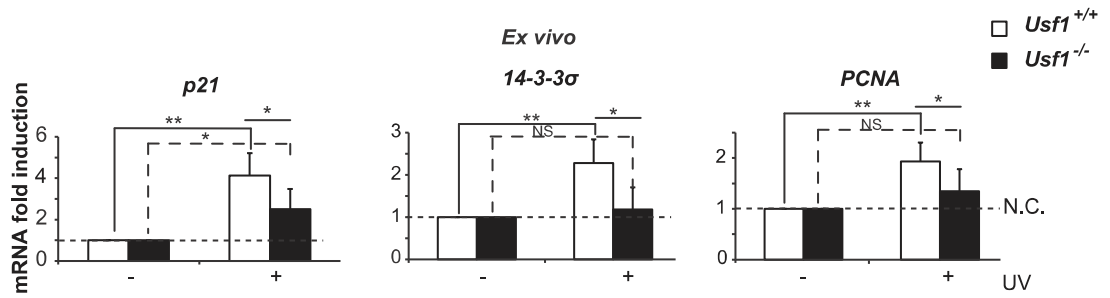


Figure 5

A**B****Figure S1**

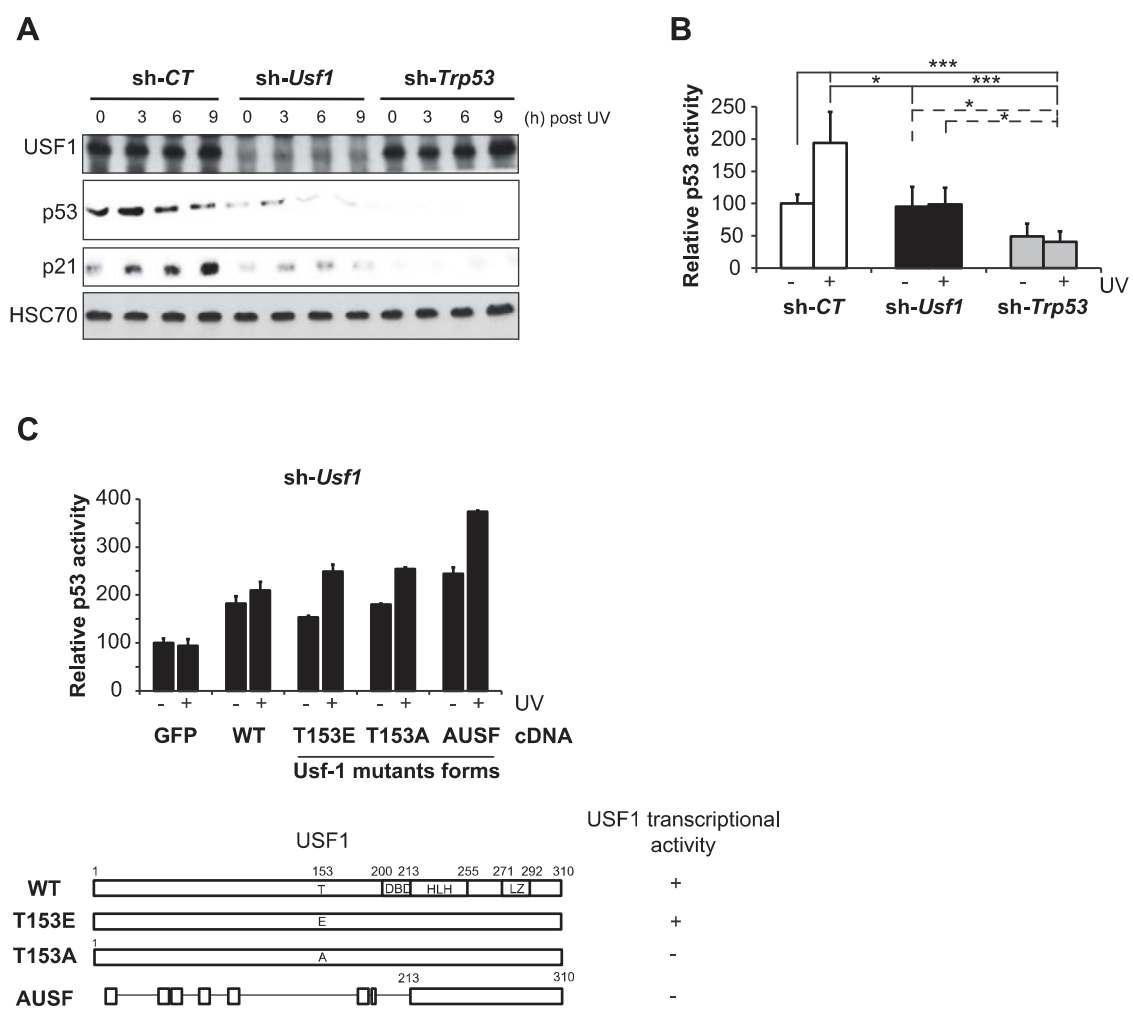


Figure S2

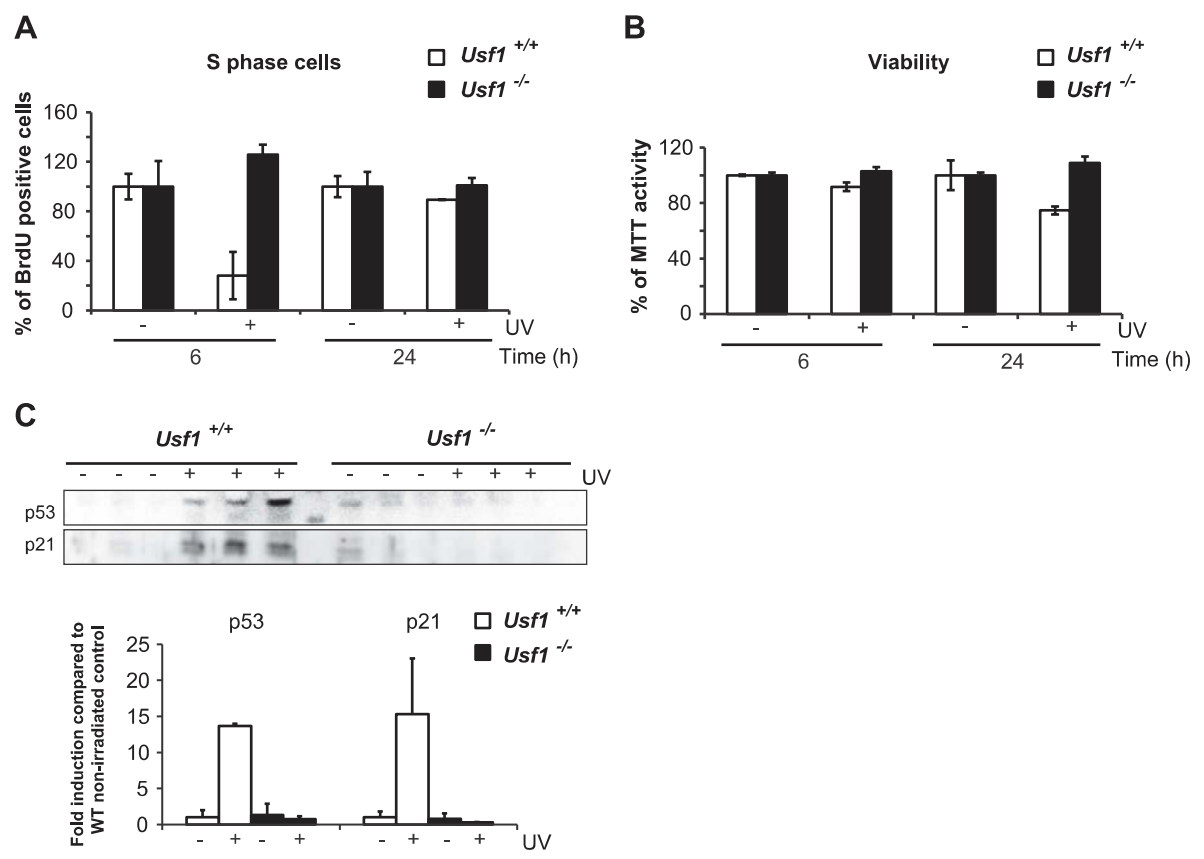


Figure S3

2.1.2. Article 2, Selon l'intensité du stress, l'activité transcriptionnelle intrinsèque d'USF1, en collaboration avec d'autres b-HLH/LZ, intervient dans la régulation du gène *CDKN1A*

Le gène *CDKN1A* code pour la protéine p21 qui est une CKI de la famille Cip/Kip [199]. Celle-ci a été impliquée dans de nombreux processus cellulaires dont la régulation de l'apoptose, la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle en réponse à l'exposition UV [578-582]. Comme pour p53, la spécificité et le l'orientation du comportement cellulaire en réponse au stress génotoxique dépendent du niveau de p21 [470,578,583]. A ce titre, pour de faibles doses d'UV, il a été décrit que la dégradation de p21 médiée par ATR et les ubiquitines ligase E3, SKP2 ou CRL4 permettait de potentialiser la réparation de l'ADN mais n'avait aucune influence sur le cycle cellulaire. A l'inverse, à de fortes doses d'UV, l'induction de l'expression de la protéine p21, et probablement sa stabilisation, induisent l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S et/ou en G2/M et inhibent l'apoptose [578,580,581,584]. A l'instar de p53, la déficience en p21 altère l'arrêt du cycle cellulaire et favorise les mutations initiées par de nombreux agents endommageant l'ADN dont les UV [199,470,580,582,585-588]. Au niveau transcriptionnel, l'expression de p21 en réponse à l'exposition UV est sous le contrôle de p53 cependant, il a été montré que selon l'intensité du stress UV, des co-régulateurs pouvaient également moduler ce contrôle [454,583,589].

Le promoteur du gène *CDKN1A* comporte de nombreuses séquences de liaison pour p53 conservées [381,583]. On y retrouve également des séquences de type boîtes E dont les positions sur le promoteur de *CDKN1A* sont spécifiques aux espèces humaine et murine (**Annexe n°5**). Chez l'homme, il a été montré que ces séquences pouvaient être occupées par des bHLH-LZ comme Myc ou Miz1. De façon importante, l'occupation de ces sites de façon concomitante à p53 permet de moduler précisément la transcription de *CDKN1A* et ceux-ci de façon positive ou négative. Ainsi, le couple Miz1/p53 active le promoteur alors que le couple Myc/p53 le réprime. De la même manière, l'association de Miz1 à TopBP1 réprime le promoteur du gène *CDKN1A* [590]. Cette complexité combinatoire permet d'exprimer la protéine p21 à un moment adapté durant la réponse au stress, afin d'orienter de façon optimale la réponse cellulaire vers l'arrêt du cycle et la réparation de l'ADN ou vers l'apoptose.

De manière intéressante l'analyse *in silico* du promoteur murin du gène *CDKN1A* (**Article 2 et Annexe n°5**) nous a permis de valider la présence de nombreux éléments de réponse à p53, mais surtout, d'identifier des boîtes E fonctionnelles permettant la fixation de plusieurs facteurs de transcription de type bHLH-LZ dont USF1, USF2 et MITF. Nous avons identifié qu'en réponse aux UV, l'occupation de ces séquences consensus par les différentes bHLH-LZ variait avec un enrichissement en facteurs USF1 et MITF et un appauvrissement en facteur USF2. Dans des conditions *in vitro*, nous avons démontré que selon la combinaison des différentes b-HLHLZ et de la protéine p53, le promoteur du gène *CDKN1A* pouvait être régulé positivement ou négativement. De façon isolée USF1, USF2, MITF et p53 sont capables d'activer le promoteur du gène *CDKN1A*. Cependant, selon la quantité des différents facteurs et leurs combinaisons, deux types d'effets opposés peuvent apparaître. Ainsi, pour un niveau élevé d'**USF1**, d'**USF2**, de **MITF** ou de **p53**, les combinaisons **USF1/USF2**, **USF1/MITF**, **USF2/USF1**, **MITF/p53**, **p53/USF2**

atténuent l'activité du promoteur du gène *CDKN1A*. En revanche, les combinaisons **USF1/p53**, **MITF/USF1**, **MITF/USF2**, **p53/USF1** et **p53/MITF** augmentent l'activité du promoteur. En analysant *in vivo* les poids des activités transcriptionnelles des facteurs USF1 et p53 sur l'expression de p21, nous avons montré un effet synergique des deux facteurs sur le contrôle positif de l'ARNm et de la protéine p21 après exposition UVB. L'utilisation de modèles cellulaires invalidés pour l'un ou l'autre des facteurs nous a permis de mettre en évidence qu'USF1 agissait vraisemblablement tardivement dans la réponse UV de façon à compléter l'induction de p21 médiée par p53. Enfin, au niveau fonctionnel, nos études suggèrent la participation de l'activité transcriptionnelle intrinsèque d'USF1 dans le contrôle du cycle de façon concomitante et additionnelle à p53. Collectivement, nous montrons qu'USF1 co-régule transcriptionnellement, avec p53, l'expression de p21 en réponse à des doses élevées d'UVB. Nos résultats suggèrent également que cette réponse pourrait être modulée *in vivo* de façon importante par un effet combinatoire de la fixation d'autres b-HLHLZ sur le promoteur du gène *CDKN1A* qu'il reste à apprécier.

2.1.2.1. Copie de l'Article 2

One car but several drivers on the cell cycle circuit:

**Spatial and temporal cooperation between bHLH-LZ transcription factors in the
UV-induced regulation of *Cdkn1a* expression**

**Sébastien Corre^{1,2}, Amine Bouafia^{1,2}, Nicolas Mouchet^{1,2}, David Gilot^{1,2}, Laura
Bachelot^{1,2}, Colin Goding⁴ and Marie-Dominique Galibert^{1,2,3,*}**

1 CNRS-UMR6290 Genetic and Development Institute of Rennes, GEO Team

2 Université de Rennes 1, UEB, BIOSIT, Rennes, France

3 CHU Rennes, Laboratoire de Génomique Médicale, Rennes, France

* E-mail: mgaliber@univ-rennes1.fr

Running head: USF1 regulates *Cdkn1a* gene expression

Abstract

The regulation of gene expression in response to the deleterious effects of UV irradiation is particularly important for the maintenance of skin integrity. The ubiquitous USF1 transcription factor plays a key role in skin protection, acting as a UV stress sensor regulating DNA repair and pigmentation. We describe here a new role for USF1 in the direct regulation of *Cdkn1a* (CDK inhibitor p21) gene expression, in the control of cell cycle progression during the G1/S phase transition following UV irradiation. Using *in vitro* and *in vivo* models, we show that the loss of USF1 results in significantly lower levels of p21 induction upon UV irradiation and that USF1 cooperates with members of the bHLH-LZ transcription factor superfamily (USF2, Mitf) and the tumor suppressor p53, to fine-tune *Cdkn1a* expression in response to UV-induced DNA damage. Thus, the induction of p21 expression upon UV irradiation is a tightly regulated process dependent on stress levels, transcription factor abundance and promoter occupancy. We demonstrate here that p21 is a direct target of USF1 and that USF1 is involved in various broad skin protection programs triggered in response to UV-induced DNA damage, for the control of cell proliferation and the maintenance of genomic stability.

Introduction

Exposure to ultraviolet radiation leads to DNA damage and the activation of various protein kinases involved in sensing and transmitting the signal to various cellular processes responsible for cell cycle arrest and DNA repair and/or apoptosis. The tight regulation of p53 tumor suppressor protein levels and activity in response to UV irradiation is particularly important, to maintain cell integrity and to prevent skin carcinogenesis (Latonen and Laiho, 2005). p53 arrests the cell cycle in G1 and G2 phases, by regulating the expression of its principal target, p21WAF1/CIP1. p21 belongs to the Cip and Kip family of CDK inhibitors, which also includes p27 and p57. These proteins inhibit the kinase activity of broad classes of CDK–cyclin complexes. Thus, p21 modulates various processes, such as cell proliferation, senescence, DNA repair, differentiation and apoptosis (Abbas and Dutta, 2009; Dotto, 2000; Gartel and Tyner, 2002).

As p21 must function transiently, at particular time points, in cell cycle arrest in response to environmental stresses, the levels and activity of this protein must be tightly regulated in cells. The tumor suppressor p53, has repeatedly been identified as the key element in the response to UV irradiation (Abd Elmageed *et al.*, 2009; Hill *et al.*, 2008). However, it was reported a few years ago that fibroblasts or keratinocytes lacking p53 were nevertheless able to control the cell cycle by upregulating *CDKN1a* expression in response to UV irradiation (Liu *et al.*, 1999; Loignon *et al.*, 1997). A large number of transcription factors have since been implicated in the direct upregulation of *CDKN1a* transcription in response to UV: NFκB (after TNFα activation) (Basile *et al.*, 2003); Mitf (Carreira *et al.*, 2005; Lekmine *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010); 14-3-3σ (Gong *et al.*, 2006); Miz-1 (Herold *et al.*, 2002).

Others have been implicated in the downregulation of *CDKN1a* expression: Myc (Herold *et al.*, 2002), Tbx2 (Abrahams *et al.*, 2008; Prince *et al.*, 2004). *CDKN1a* RNA is also stabilized in a p16 (CDKN2a)-dependent manner during the UV response, by the binding of HuR protein to the mRNA (Al-Mohanna *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2000). In addition, the regulation of *CDKN1a* expression is even more complex being dependent on the activation of both Chk2 kinase by the ATM/ATR pathway (Aliouat-Denis *et al.*, 2005), ERK (Tang *et al.*, 2002), and PI3K/Akt (Murray *et al.*, 2003).

Parallel to the data for *CDKN1a* mRNA induction following UV exposure, conflicting results have been published concerning the changes to p21 levels (increase or decrease) after UV induction. These levels depend on the cell type or irradiation level, for adapted a tight regulation of the cell cycle and DNA repair or apoptosis (Bendjennat *et al.*, 2003; Itoh and Linn, 2005; Lee *et al.*, 2006). Different studies have described the CUL4-DDB1-Ctd2 and PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation in response to UV (Abbas and Dutta, 2009; Soria and Gottifredi, 2010). In response to UV activation of the ATM/ATR pathway, GSK3 β kinase phosphorylates the Ser-114 residue of p21, promoting also the ubiquitylation of this protein and its degradation in the cytosol after a transient passage through the nucleus to promote DNA repair (Lee *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2007).

We have shown that the ubiquitous transcription factor USF1 (upstream stimulating factor 1), a bHLH-LZ factor of Mitf and Myc superfamily, is a crucial regulator of the stress response in the skin (Corre and Galibert, 2005). This factor helps to protect

the skin against UV irradiation by regulating the expression of pigmentation genes (Corre *et al.*, 2006; Corre *et al.*, 2004; Galibert *et al.*, 2001). It has also been implicated in the subsequent regulation of nucleotide excision repair (NER) (Baron *et al.*, 2012). It can therefore be seen as a stress sensor enabling the cell to protect itself against environmental challenges (Corre *et al.*, 2009). As USF factors have already been implicated in cell cycle regulation (Jung *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2006) and since *CDKN1a* expression is regulated by bHLH-LZ transcription factors, we explored the possibility that USF1 is involved in the precise UV-induced regulation of *CDKN1a* expression.

In this study, we used various *in vitro* and *in vivo* models and several molecular strategies to show that the transcription factor USF1 regulates the transcription of *Cdkn1a* in response to UV irradiation. USF1 bound the consensus E box element (CANNTG) of the *Cdkn1a* promoter directly in response to UV induction, increasing the expression of the gene at both the mRNA and protein levels. We also demonstrated that this tight regulation of p21 expression was associated with cross-regulation by various transcription factors (p53, USF2, Mitf), highlighting the importance of p21 levels and function for cell cycle control and DNA repair promotion in response to UV-induced DNA damage.

Results

Regulation of bHLH-LZ transcription factors (USF and Mitf) occupancy onto E-box motifs in the *Cdkn1a* promoter in response to UV

The ubiquitous USF (USF1 and USF2) and the melanocyte-specific Mitf transcription factors bind DNA at the same specific consensus E-box motif (CANNTG) and do share common target genes. Mitf has been implicated in the regulation of *Cdkn1a* expression and cell cycle progression (Carreira *et al.*, 2005). We investigated whether USF1 was also involved in the induction of *Cdkn1a* expression by UV, by analyzing quantitative ChIP promoter occupancy by the various bHLH-LZ transcription factors before and after the exposure of B16 melanoma cells to UV light (Fig. 1). We first carried out an *in silico* analysis with both Consite (<http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITE/consite/>) and zPicture (Rvista 2) (<http://zpicture.dcode.org/>) (data not shown), identifying the presence of three potential E-box consensus sites for bHLH-LZ transcription factors in both upstream and proximal regions of the *Cdkn1a* promoter (Fig. 1A). We carried out ChIP assays specifically targeting USF1, USF2 and Mitf, to determine whether these transcription factors were able to bind to the previously identified E-boxes present in the *Cdkn1a* promoter (Fig. 1B). As shown in figure 1B, we demonstrated that these transcription factors bound both the proximal and upstream regions of the *Cdkn1a* promoter (figure 1B). These data were confirmed by *in vitro* DNA-binding assays (data not shown), evaluating the direct interaction between USF factors and the E-box motifs (CANNTG) present in the proximal (-193) and upstream (-1466) regions of the *Cdkn1a* promoter. In basal conditions, USF and Mitf bound indifferently, and at similar levels, to the upstream and proximal regions of the *Cdkn1a* promoter. One hour after UVB induction (0.6 kJ/m²), USF1 occupancy of the various E-boxes was

found to have significantly increased, whereas occupancy was unchanged for the other bHLH-LZ transcription factors (USF2 and Mitf) (Fig. 1B). We investigated the mechanisms underlying the UV regulation of *Cdkn1a* gene expression by bHLH-LZ further, by performing quantitative ChIP analysis to determine DNA occupancy by transcription factors over a period of three hours following the UV irradiation of B16 cells (0.6 kJ/m²) (Fig. 1C). USF1 occupancy increased rapidly in both the upstream and proximal regions of the *Cdkn1a* promoter after the exposure of B16 cells to UV (Fig. 1C), while Mitf occupancy increased significantly (by a factor of 2) only in the proximal region. In order to assess whether this mechanism of site occupancy in response to UV might be a general process, we examined the tyrosinase (*Tyr*) promoter gene that is reported to be a downstream target of both USF1 and Mitf (Galibert *et al.*, 2001; Yasumoto *et al.*, 1994). We first confirmed by *in vitro* DNA-binding assays that USF and Mitf transcription factors bound E boxes on the *Tyr* promoter under our conditions (Fig. S1A). We demonstrated by quantitative ChIP that the dynamic of promoter occupancy at the E box sites by USF and Mitf in response to UV was comparable to the one observed for *Cdkn1a* promoter (Fig. S1B). Indeed, under basal conditions, USF and Mitf bound indifferently, at similar levels, to the upstream and proximal regions of the *Tyr* promoter. In response to UV (0.6 kJ/m²), the occupancy of sites in the upstream regions by bHLH-LZ transcription factors did not change, while more proteins were associated with the proximal region (-183) and was regulated over time (Fig. S1B). 30 minutes after UV exposure (0.6 kJ/m²), USF1 binding was significantly increased and detached 1 h after. At this time a four-fold increase in Mitf binding was observed, and remained constant until 3 h. At three hours, a doubling of USF2 binding to the proximal region was then observed.

Together, these results defined a precise regulation of bHLH-LZ occupancy over time after UV irradiation.

Induction of *Cdkn1a* expression by the different bHLH-LZ transcription factors

Having shown that *Cdkn1a* promoter occupancy was tightly regulated, we carried out luciferase assays to establish a link with the regulation of its expression. B16 cells were transfected with a construct in which the *Cdkn1a* promoter (-2 kb/+21 b) was inserted upstream from the luciferase reporter gene, together with increasing amounts of a plasmid encoding recombinant USF1 or USF2 (pCMV-USF) (Corre *et al.*, 2004). We first confirmed that both ubiquitous transcription factors, but particularly USF1, induced *Cdkn1a* expression (Fig. 2A). However, no synergic effect of USF1 and USF2 was observed for *Cdkn1a* induction. The presence of mutated E boxes (upstream and proximal regions) prevented the induction of *Cdkn1a* expression by USF transcription factors. We therefore carried out similar luciferase assays in the presence of various amounts of bHLH-LZ (USF1, USF2 and Mitf) and also p53, since *Cdkn1a* (p21) mRNA expression is mainly induced by the tumor suppressor in response to UV (Abd Elmageed *et al.*, 2009). USF1 was the most efficient for activating *Cdkn1a* expression *in vitro* (Fig. 2B), and displayed synergy with small amounts of p53 (100ng) (Fig. 2B), which was abolished in the presence of larger amounts of p53 (500ng). Similar synergy was obtained with high level of Mitf and low level of USF2 (Fig. 2C). The results obtained with a high level of USF1 with a low level of p53 were not reproduced when the amounts of the two factors were reversed, with additive effects on *Cdkn1a* expression (Fig. 2D). These *in vitro* results suggested that *Cdkn1a* expression is synergically activated in the presence of bHLH-LZ and p53 transcription factors, clearly dependently on their amount. Again, similar

activations of the *Tyr* promoter by bHLH-LZ were obtained using luciferase assays (Fig.S2A-D), with the highest activity recorded for USF1 (Fig. S2B). In parallel to the regulation of bHLH-LZ dynamic of occupancy in response to UV, the abundance of the different bHLH-LZ and p53 is shown to be particularly important to increase target genes expression.

USF1 is involved in the UV-induced regulation of *CDKN1a* expression

Since UV-induced *Cdkn1a* expression is also detected in various cell lines lacking p53 (Liu *et al.*, 1999; Loignon *et al.*, 1997; Wani *et al.*, 2002) we investigated whether USF1 could support the *Cdkn1a* expression under these conditions. We tested this hypothesis by studying mRNA and protein levels after UVB induction in stable B16 cells knock-down or not for *Usf1* with small hairpin RNA (lentiviral). In response to increasing doses of UVB (0 to 1.5 kJ/m² of UVB) corresponding to viable levels of stress, we observed a dose-dependent increase in p21 protein levels (Fig. 3A). Levels of p21 protein remained unchanged in both control and *Usf1* KD B16 cells after exposure to low doses of UVB (0.3 kJ/m²), but the strong increase in p21 protein levels 5h following exposure to higher doses of UVB (1.2 kJ/m²) was found to be significantly more important for control cells than for *Usf1* KD cells (Fig. 3A right panel). This difference in p21 induction did not correlate with p53 level, which was similar 5 after high-dose UV induction (1.2 kJ/m²) in both cell lines, suggesting a role of USF1. Having identify an effective dose for differential *Cdkn1a* induction (1.2 kJ/m²), we followed the expression at the indicated times (from 0 to 24 h) in B16 cells depleted for USF1 or p53. Peak levels of *Cdkn1a* mRNA production in response to UVB exposure in *Usf1* KD cells were half those in control and *Trp53* KD cells (Fig. 3B). Conversely, basal *Cdkn1a* mRNA levels were affected only in *Trp53* KD B16 cells (Fig. 3B right panel). This upregulation of *Cdkn1a* gene expression in response

to UV was associated with an increase in p21 protein level 9 h after UVB exposure (by a factor of up to 10 in control conditions). In the absence of p53 or USF1, p21 protein levels increased, but to a significantly smaller degree, due to the prevention of basal and UV-induced *Cdkn1a* transcription, respectively (Fig. 3C).

We next investigated the respective contributions of mRNA synthesis and protein degradation to the regulation of p21 protein levels, by comparing the induction of p21 protein production by UV in control and *Usf1* KD B16 cells with and without proteasome inhibitor treatment (MG132, 10 μ M) and after the blocking of *de novo* p21 synthesis with the translation inhibitor cycloheximide (CHX, 20 μ M) (Fig. S3A). In B16 control cells, p21 protein levels increased significantly between 6 and 24 h after UV induction (Fig. S3B). The addition of MG132 had no effect on basal p21 protein levels, but the addition of CHX significantly decreased the upregulation of p21 levels by UV. In our experimental conditions, the induction of p21 production by UV was associated with the regulation of *Cdkn1a* mRNA levels only (no effect on protein degradation). As previously described, p21 levels were not correlated with p53 protein levels, which fluctuated over time following UVB irradiation, due to proteasomal degradation (Maki and Howley, 1997). A similar experiment in *Usf1* KD B16 cells showed an upregulation of p21 protein levels that was significantly smaller and occurred later than in control cells (Fig. S3C). In the presence of CHX, p21 induction by the irradiation of *Usf1* KD cells was completely abolished (Fig. S3C). These results confirm the role of USF1 in the upregulation of *Cdkn1a* transcription by UV irradiation.

To strengthen the role of USF1 in regulating *Cdkn1a* expression in response to UV, we performed transient transfections using human expression vectors (pCMV), to

rescue USF1 and p53 function (Corre *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2011) in control, *Usf1* and *Trp53* KD B16 cells. *Cdkn1a* expression levels were very low in *Usf1* and *Trp53* KD cells, particularly 6 h after UV, but re-expression of the genes encoding the USF1 or p53 transcription factors restored the upregulation of p21 expression in response to UV in B16 depleted cells, to similar levels as observed in control cells (Fig. 4A). Using luciferase reporter assays, co-transfection with the USF1 construct resulted in higher levels of *Cdkn1a* transcription (Luc) in response to UV *in vitro* than were observed in control conditions, but the impact of transfection with p53 was significantly smaller (Fig. 4B). In the absence of p53, *Cdkn1a* expression was no longer induced by UV after transfection with USF1, suggesting a sequential activation of p21 transcription by these two factors.

USF1 regulates *Cdkn1A* mRNA synthesis *in vivo* after the exposure of skin to solar simulator radiation (SSR)

We addressed the biological relevance of the role of USF1 for the UV-induction of *Cdkn1a* by comparing its expression in *Usf1* KO (*Usf1*^{-/-}) and WT (*Usf1*^{+/+}) skin mice, following irradiation with a solar simulator (SSR: 1 MED = 21 mJ/cm²) (Fig. 5). We observed an upregulation of *Cdkn1a* expression 3 h after exposure to SSR in both WT mice and KO mice, but this upregulation was significantly weaker in the absence of the transcription factor. Indeed, *Cdkn1a* mRNA levels remained high in the WT between 3 and 15 hours after SSR irradiation, whereas they decreased rapidly after irradiation in *Usf1* KO mice (Fig. 5). These results provided *in vivo* confirmation of the role of USF1 in regulating *Cdkn1a* expression.

USF1 is required for G1/S phase transition during cell cycle regulation by UV

We investigated the correlation between the role of USF1 in the regulation by UV of *Cdkn1a* expression and its potential consequences for cell cycle control and progression, by carrying out cell cycle analysis in control (sh-CT), *Usf1* KD (sh-*Usf1*) and *Trp53* KD (sh-*Trp53*) B16 cells. Cells were first synchronized in G1/S phase by a double thymidine/aphidicolin block. They were left unexposed or were exposed to UV irradiation (1.2 kJ/m^2) and the cell cycle block was then released. No difference in cell cycle progression was observed between the various cell types, in the presence or absence of the USF1 and p53 transcription factors when the cell cycle block was released only after the addition of fresh medium (Fig. 6). When cells were irradiated with UV light before the release of the cell cycle block, we observed a significant slowing of cell cycle progression only in the control cells. In the absence of both USF1 and p53, the rate of progression through the cell cycle was similar to that in non-irradiated cells. In conclusion, as the lack of USF1 and p53 significantly decreases the upregulation of *Cdkn1a* expression in response to UV, the absence of these transcription factors has severe consequences for cell cycle control. Indeed, the cells became insensitive to UV and were unable to arrest the cell cycle in G1/S phase.

Discussion

The DNA damage in the skin elicited by exposure to UV irradiation leads to an accumulation of p53 (Zhan *et al.*, 1993) and activation of the transcription of target genes. This results in cell-cycle arrest, allowing time for the repair of DNA damage or the elimination of damaged cells by apoptosis. An absence of proper control of the cell cycle in mammals can drive cellular transformation and tumor growth. Regulation of the expression of the p53 target p21, a cell cycle inhibitor, in response to UV irradiation, is a critical event controlling skin protection and the maintenance of genomic stability. The level of expression of p21 has been shown to be tightly regulated by many different factors and in a UV dose-dependent manner, at both the mRNA and protein levels (Abd Elmageed *et al.*, 2009). The tumor suppressor p53 is widely considered to be the principal regulator of UV-induced p21 expression (el-Deiry *et al.*, 1993; Liu and Pelling, 1995), but it has been shown that, in the absence of p53, p21 expression remains induced in several cell lines (Aliouat-Denis *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1999; Loignon *et al.*, 1997; Wani *et al.*, 2002).

We demonstrate here that p53 is not the unique actor and that USF is required for the upregulation of p21 expression in response to UV. Indeed, the ubiquitous upstream stimulatory factors bind consensus regulatory elements in the *Cdkn1a* promoter, thus regulating the expression of p21 in cooperation with p53. These factors coordinate the p21 expression program in the skin in response to UV, through tight spatial and temporal regulation of *Cdkn1a* promoter occupancy. We thus propose a model (Fig. 7) in which, during early UV response in the skin, specific regulation of *CDKN1a* expression occurs, based on the levels of bHLH-LZ and p53 transcription factors, through their ability to bind to their responsive elements in the

promoter and their transcriptional activity. In response to low doses of UV and at early time, USF1 activity is particularly important both for the direct induction of *Cdkn1a* expression and for the regulation of p53 levels and activity (Bouafia *et al.*, 2014). The presence of this ubiquitous transcription factor is crucial to halt the cell cycle. At higher doses of UV and at later time points after the initial stress, the other bHLH-LZ transcription factors, such as p53, amplify *CDKN1a* mRNA synthesis, thereby reinforcing the cell cycle arrest (Fig. 7) The affinity of transcription factors for the promoter after exposure to UV may be correlated with their efficacy for activating p21 expression, as previously shown for late UV responses with the p53 transcription factor (Magrini *et al.*, 2007).

In conclusion, the amount of p21 produced in response to UV, which is dependent on the transcriptional activation of the corresponding gene by bHLH-LZ transcription factors and p53, is particularly important for cell cycle control in skin cells. A lack of these factors may have severe consequences for cell cycle control after the activation of p21 expression and for the maintenance of genomic stability. This loss of function is frequently observed in cancers (Muller and Vousden, 2013), particularly after mutation, as in melanoma (Grill *et al.*, 2013), or in response to stress after posttranslational modifications or degradation following the activation of specific pathways (Corre *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2010). The ability of the various transcription factors to activate p21 expression in the skin in response to UV exposure is critical, to prevent genomic instability, and is therefore tightly controlled in terms of expression levels in tissues and transcriptional activity.

This study also highlights the subtle nature of the modulation of the transcriptional regulation of the response to environmental stresses, such as UV, by various transcription factors that are either ubiquitous (USF, p53) or specifically expressed in specific cell lineages (Mitf). The bHLH-LZ transcription factors, such as USF, Mitf or Myc, but also p53 have several target genes in common (Fig. 8) that are crucial for skin pigmentation (*TYR*, *TRP1*), cell proliferation (*CDKN1a*, *CDKN2a*), DNA repair (*DDB2*), apoptosis (*Bcl2*, *Bax*) and differentiation (*Gli2*, *CTNNB1*). It is therefore particularly important to decipher the mechanisms modulating their activity in response to stress.

Experimental Procedures

Mice

C57BL/6J 129SV *Usf1* WT and KO mice were kindly provided by Sophie Vaultont (Cochin Institute) (Vallet *et al.*, 1998). Mice were kept in specific pathogen-free (SPF) conditions in our accredited animal facilities at the BIOSIT federative biological research structure of Rennes University (Agreement Number: A35-248-40). All procedures were carried out in accordance with the Public Health Service Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All experiments were performed in accordance with national guidelines for the use of animals in biomedical research and with the approval of the local ethics committee for animal experimentation at Rennes 1 University (Agreement Number: 5347).

Cell culture

Mouse B16 F0 melanoma cell lines were maintained in RPMI-1640 medium (Cat No. 21875-034, Gibco BRL, Invitrogen), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Invitrogen), at 37°C, in a controlled atmosphere (10% CO₂).

shRNA experiments

Lentiviral particles carrying shRNA vectors targeting murine *Usf1* (sh-*Usf1*; SHCLNV-NM_009480 clone TRCN0000302005) and *Trp53* (sh-*Trp53*; SHCLNV-NM_011640 clone TRCN000030210844), and a scrambled shRNA (sh-CT (SHC002V) were purchased from Sigma-Aldrich, St Louis, MO. The multiplicity of infection (MOI) used was as recommended by Sigma-Aldrich. After infection, the cells were maintained

under selection, in the presence of puromycin (Invivogen, San Diego, CA).

UV irradiation

UV irradiations was performed with ultraviolet bulbs (312 nm), with a Stratalinker apparatus (Stratagene) or a solar simulator (Solarlight 16S).

The backs of the mice were irradiated with one MED (21 mJ/cm²) of solar component (85% UVA, 15% UVB). At the time points indicated, the irradiated skin was removed during skin biopsy and placed directly in RNA Later buffer (Qiagen) or in liquid nitrogen for subsequent protein analysis.

B16 cells were irradiated with UV-B according to a protocol described elsewhere (Corre *et al.*, 2004).

Cell cycle synchronization

Control (sh-CT), *Usf1* knockdown (sh-*Usf1*) and *Trp53* KD (sh-*Trp53*) B16 melanoma cells were synchronized by a double thymidine/aphidicolin block (16 hours of thymidine (2 mM) treatment, 9 hours of release, 16 hours of aphidicolin (5 µg/ml) treatment, to obtain a population of cells arrested in G1/S phase). The cells were left unexposed or were exposed to UV (1.2 kJ/m²) and they were then released into fresh medium, to enter the cell cycle. The distribution of cells in the various phases of the cell cycle was investigated by flow cytometry measurements of DNA content. Cells were prepared for flow cytometry by treatment with trypsin and resuspension in complete medium. They were then harvested by centrifugation, washed in PBS and centrifuged again. The cells were fixed by incubation in ice-cold ethanol and stored at

4°C. Before flow cytometry analysis, cell pellets were resuspended in 1 ml of DNA staining solution (2.5 µg/ml propidium iodide, 0.2 mg/ml RNase A in PBS) and incubated for 15 minutes. They were then analyzed on a BD (Biosciences) FACS CALIBUR machine.

Gene expression analysis

RNA was extracted with the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel) and quantified in a Nanodrop spectrometer. For skin explants, an additional Trizol/chloroform purification step was required to eliminate protein contaminants. The cDNA was obtained by reverse transcription with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem) from 1 µg of total RNA. Gene expression was analyzed by subjecting the cDNA to qPCR in sealed 384-well microtiter plates, with the SYBR Green TM PCR Master Mix (Applied Biosystem) and the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Relative transcript levels were determined by the delta Ct method. The mRNA levels at each time point after stimulation are expressed as fold increases with respect to non-irradiated cells. Data were normalized independently with respect to at least two housekeeping genes (*HPRT* and *GAPDH*). Each experiment was carried out at least twice and each time point was repeated in triplicate. Forward (F) and reverse (R) primers were designed with the Universal Probe Library Assay Design Center (Roche®) and their efficiency was checked before this study (sequences available on request).

Western blot analysis

Harvested cells were lysed immediately, by incubation for 30 minutes in lysis buffer (supplemented with protease and phosphatase inhibitors). Equal amounts of protein

per well were denatured by heating in Laemmli buffer for 5 minutes at 95°C and resolved by SDS-PAGE in a 12% polyacrylamide gel. Membranes were probed with the appropriate antibodies and signals were detected with the LAS-3000 Imaging System (Fujifilm) and quantified with ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Luciferase assays

Cells were plated at 60 to 70% confluence, in 12-well plates containing medium supplemented with 10% SVF without antibiotics, in which they were incubated for 12 h. Cells were left untransfected or were cotransfected with *p21* promoter-Luc reporter vector (-2 kb/+21), or *Tyr* promoter-Luc (-300/+80) and pCMV (empty, USF1, USF2, Mitf or p53), as previously described (Corre *et al.*, 2009; Corre *et al.*, 2004; Galibert *et al.*, 2001). The transfection mixture, containing up to 500 ng of plasmid DNA, was prepared in Optimem medium (Invitrogen) and used to transfect cells by incubation for 3 h in the presence of Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Six hours after transfection, the medium was replaced with fresh medium supplemented with 10% SVF and 1% antibiotics. Cells were then irradiated with UV light, 48 h later, as described above. They were harvested at various time points up to 6 h after UV exposure. The cells were then passively lysed and luciferase activity was quantified in a Microplate Luminometer Centro LB 960 (Berthold) with the Luciferase Reporter Assay System (Promega).

Antibodies

Anti-USF1 (C:20, sc-229) and anti-HSC70 (B-6, sc-7298) antibodies were purchased from Santa Cruz (Clinisciences). Anti-p53 (1C12, 2524) and anti-MDM2 (AB1)

antibodies were purchased from Cell Signaling. Anti-total γ H2AX and anti-p21 (ab7960) antibodies were purchased from Abcam.

Figure legends

Figure 1: Transcription factor occupancy of the *Cdkn1a* promoter is regulated in response to UV

(A) Graphic representation of the mouse *Cdkn1a* (p21) promoter. E-boxes are shown in gray and the primers used for ChIP analysis are indicated by arrows.

(B) *In vivo* chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) in B16 cells, with antibodies against USF1, USF2 and Mitf or non-specific IgG. The DNA recovered under basal or UV-irradiation conditions (UVB 0.6 kJ/m²) was subjected to PCR with specific primers binding to the proximal and upstream regions of the *Cdkn1a* promoter.

(C) *In vivo* chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) in B16 cells with antibodies against USF1, USF2 and Mitf or non-specific IgG. The DNA recovered under basal or UV-irradiation conditions (UVB 0.6 kJ/m²) was subjected to real-time quantitative PCR, to quantify the transcription factor enrichment of the *Cdkn1a* promoter.

Figure 2: Regulation of *Cdkn1a* expression by the various bHLH-LZ transcription factors

(A) Luciferase assays with wild-type pGL3-p21 promoter-Luc (-2 kb/+21) (dark gray) or with a promoter with mutated E-boxes (light gray) in the presence of various concentrations of pCMV-USF1 and USF2 recombinant proteins after the transfection of B16 cells. The presence of the recombinant proteins was confirmed by the western blotting of B16 cell extracts 48 h after cotransfection, with a specific anti-SV5 antibody for USF1, an anti-HA antibody for USF2 and an anti-lamin B antibody as a loading control.

(B) Luciferase assays in B16 cells cotransfected with pGL3-p21 promoter-Luc and with constructs encoding recombinant proteins, with a constant USF1 concentration but various amounts of the USF2, Mitf and p53 transcription factors.

(C) Luciferase assays in B16 cells cotransfected with pGL3-p21 promoter-Luc and with constructs encoding recombinant proteins, with a constant Mitf concentration but various amounts of the USF1, USF2 and p53 transcription factors.

(D) Luciferase assays in B16 cells cotransfected with pGL3-p21 promoter-Luc and with constructs encoding recombinant proteins with a constant concentration for p53 and various amounts of the USF1, USF2 and Mitf transcription factors. Three independent experiments were performed in each case.

Figure 3: The induction of *Cdkn1a* expression by UV is impaired in USF1-deficient B16 melanoma cells

Analysis of *Cdkn1a* expression in control (sh-CT) and *Usf1* knockdown (sh-*Usf1*) and *Trp53* KD (sh-*Trp53*) B16 melanoma cells.

(A) Western-blot analysis of p53 and p21 (encoded by *Cdkn1a*) protein levels in the cell lines in response to various doses of UVB (0 to 1.5 kJ/m²). Hhistone H2AX phosphorylation was used as a UV control and HSC70 was used as a loading control. Levels of p21 protein induction 5 h after UVB irradiation were determined by densitometry with ImageJ. The graph shows the induction of p21 protein with respect to the non-exposed control.

(B) (left panel) RT-qPCR analysis of *Cdkn1a* gene induction in control (sh-CT), *Usf1* KD (sh-*Usf1*) and *Trp53* KD (sh-*Trp53*) B16 cells at various times after irradiation with 1.2 kJ/m² UVB. *Cdkn1a* transcript induction was determined after normalization with respect to *HPRT* ($\Delta\Delta$ CT method). Error bars indicate the SEM ($n=3$). Student's *t*

test was carried out to determine the significance of differences for comparisons of UV vs. control (*) or between KD cell lines (°). (right panel) RT-qPCR analysis of basal expression levels for the *Cdkn1a*, *Trp53* and *Usf1* genes.

(C) (upper panel) Western-blot analysis of p21, Usf1 and p53 protein levels at the corresponding time points after UVB irradiation (1.2 kJ/m²). HSC70 was used as a loading control. (lower panel) Protein induction 5 h after UVB irradiation was determined by densitometric quantification with ImageJ. The graph shows the mean fold-induction of proteins with respect to the non-exposed controls (*n*=3). Student's *t* tests were used to assess the significance of differences for comparisons of UV vs. control (*) or between KD cell lines (°).

Figure 4: The transfection of B16 USF1 KD cells with a construct encoding USF1 restores the induction of *Cdkn1a* expression by UV

(A) Western-blot analysis of p21, Usf1 and p53, in the absence of irradiation or 5 h after the irradiation with UVB (1.2 kJ/m²) of control (sh-CT), *Usf1* KD (sh-*Usf1*) and *Trp53* KD (sh-*Trp53*) B16 melanoma cells. Cells were not transfected or were transfected 48 h before UV exposure with pCMV recombinant protein constructs, to rescue USF1 or p53 expression. HSC70 was used as a loading control. Proteins were quantified densitometrically with ImageJ.

(B) Luciferase assays in control (sh-CT), *Usf1* KD (sh-*Usf1*) and *Trp53* KD (sh-*Trp53*) B16 cells cotransfected with pGL3-p21 promoter-Luc and with constructs encoding recombinant proteins, with various concentrations of the USF1 and p53 transcription factors.

Figure 5: The levels of *Cdkn1a* expression induced by solar simulator irradiation are lower in *Usf1*-deficient mice

Analysis of *Cdkn1a* expression in control (WT) and *Usf1* knockdown (KO) mice after UV irradiation. RT-qPCR analysis of the induction of expression of the *Cdkn1a* (upper) and *Usf1* (lower) genes in WT (white) and *Usf1* KO (gray) mice in the skin 5 h after solar simulator (1 minimal erythemal dose 21 mJ/cm²) irradiation. Transcript levels were assessed after normalization with respect to *HPRT* ($\Delta\Delta$ CT method). Error bars indicate the SEM ($n=6$). A Wilcoxon test was used to assess the differences for comparisons of UV vs. control (*) or between WT and KO mice (#).

Figure 6: The loss of USF1 in B16 melanoma cells impairs cell cycle control during the G1/S phase transition in response to UV

Analysis of the percentage of cells in the G1/S, S and G2/M phases of the cell cycle after the release of control (sh-*CT*), *Usf1* KD (sh-*Usf1*) and *Trp53* KD (sh-*Trp53*) B16 cells, with and without UV irradiation (1.2 kJ/m²).

Figure 7: Model of the regulation of *CDKN1a* expression by the various transcription factors in response to UV

Figure 8: IPA representation of previously identified target genes for the p53, USF1, USF2, Myc and Mitf transcription factors

(A) Identification, by Ingenuity Pathway Analysis (IPA), of genes that have been shown to be regulated jointly by the various transcription factors (p53, USF1, USF2, Myc and Mitf). Several of these factors play a crucial role in regulating skin pigmentation, cell proliferation, DNA repair, apoptosis or immune responses.

(B) Identification, by IPA, of canonical pathways corresponding to the previously identified target genes for the various transcription factors.

Figure S1: The transcription factor occupancy of the *Tyr* promoter is regulated in response to UV

(A) Graphical representation of the mouse *Tyrosinase* (*Tyr*) promoter. E-boxes are shown in gray and the primers used for ChIP analysis are indicated by arrows.

(B) *In vivo* chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) in B16 cells, with antibodies against USF1, USF2 and Mitf or non-specific IgG. The DNA recovered under basal or UV irradiation conditions (UVB 0.6 kJ/m²) was subjected to real-time quantitative PCR to quantify the transcription factor enrichment of the *Tyr* promoter.

Figure S2: The regulation of *Tyr* expression by the various bHLH-LZ transcription factors.

(A) Luciferase assays with wild-type pGL3-*Tyr* promoter-Luc (-300/+80) (black) or with a promoter with mutated E-boxes (white) in the presence of different concentrations of pCMV-USF1 and USF2 recombinant proteins, after the transfection of B16 cells.

(B) Luciferase assays in B16 cells cotransfected with pGL3-*Tyr* promoter-Luc and with constructs encoding recombinant proteins, with a constant concentration for USF1 and various amounts of the USF2 and Mitf transcription factors.

(C) Luciferase assays in B16 cells cotransfected with pGL3-*Tyr* promoter-Luc and with constructs encoding recombinant proteins, with a constant concentration for USF2 and various amounts of the USF1 and Mitf transcription factors.

(D) Luciferase assays in B16 cells cotransfected with pGL3-Tyr promoter-Luc and with constructs encoding recombinant proteins, with a constant concentration for Mitf and various amounts of the USF1 and USF2 transcription factors. Three independent experiments were performed in each case.

Figure S3: USF1 regulates *CDKN1a* expression without affecting protein stability or degradation via the proteasome

(A) Schematic representation of an experiment investigating *de novo* p21 in response to UV conducted in control and USF1 KD B16 melanoma cells. Cells were first treated for 3 h with the MG132 inhibitor (10 μ M) and the medium was then replaced with a medium containing the translation inhibitor cycloheximide (CHX; 20 μ M). Before medium replacement, the cells were or were not irradiated with 1.2 kJ/m^2 UVB and recovered at the indicated time point.

(B) Western-blot analysis of the regulation of the p21, USF1 and p53 proteins after the exposure to UV (1.2 kJ/m^2) of B16 melanoma control cells (sh-*C7*) or USF1 knockdown cells (sh-*Usf1*). HSC70 was used as a loading control.

(C) Western-blot analysis after the exposure to UV (1.2 kJ/m^2) of control B16 melanoma cells treated with MG132 inhibitor (10 μ M) before replacement of the medium with a medium containing the translation inhibitor cycloheximide (CHX; 20 μ M). HSC70 was used as a loading control.

Ethics statement

This animal study was carried out in accordance with the 3R legislation (Replace-Reduce-Refine). It has been declared and approved by the French Government

Board. Animal welfare was a constant priority in this study and the animals were killed under anesthesia.

Acknowledgment

The authors would like to thank the staff of the animal facilities for animal care. We would also like to thank Rennes University, the CNRS and the IFR-BIOSIT for their support and facilities.

References

- Abbas, T., and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9, 400-14.
- Abd Elmageed, Z. Y., Gaur, R. L., Williams, M., Abdraboh, M. E., Rao, P. N., Raj, M. H., Ismail, F. M., and Ouhtit, A. (2009). Characterization of coordinated immediate responses by p16INK4A and p53 pathways in UVB-irradiated human skin cells. *J Invest Dermatol* 129, 175-83.
- Abrahams, A., Mowla, S., Parker, M. I., Goding, C. R., and Prince, S. (2008). UV-mediated regulation of the anti-senescence factor Tbx2. *J Biol Chem* 283, 2223-30.
- Al-Mohanna, M. A., Al-Khalaf, H. H., Al-Yousef, N., and Aboussekhra, A. (2007). The p16INK4a tumor suppressor controls p21WAF1 induction in response to ultraviolet light. *Nucleic Acids Res* 35, 223-33.
- Aliouat-Denis, C. M., Dendouga, N., Van Den Wyngaert, I., Goehlmann, H., Steller, U., Van De Weyer, I., Van Slycken, N., Andries, L., Kass, S., Luyten, W., *et al.* (2005). p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2. *Mol Cancer Res* 3, 627-34.
- Baron, Y., Corre, S., Mouchet, N., Vaultont, S., Prince, S., and Galibert, M. D. (2012). USF-1 is critical for maintaining genome integrity in response to UV-induced DNA photolesions. *PLoS Genet* 8, e1002470.
- Basile, J. R., Eichten, A., Zacny, V., and Munger, K. (2003). NF-kappaB-mediated induction of p21(Cip1/Waf1) by tumor necrosis factor alpha induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes. *Mol Cancer Res* 1, 262-70.

- Bendjennat, M., Boulaire, J., Jascur, T., Brickner, H., Barbier, V., Sarasin, A., Fotedar, A., and Fotedar, R. (2003). UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair. *Cell* 114, 599-610.
- Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S. A., Galibert, M. D., Denat, L., Larue, L., and Goding, C. R. (2005). Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature* 433, 764-9.
- Corre, S., and Galibert, M. D. (2005). Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res* 18, 337-48.
- Corre, S., Mekideche, K., Adamski, H., Mosser, J., Watier, E., and Galibert, M. D. (2006). *In vivo* and *ex vivo* UV-induced analysis of pigmentation gene expressions. *J Invest Dermatol* 126, 916-8.
- Corre, S., Primot, A., Baron, Y., Le Seyec, J., Goding, C., and Galibert, M. D. (2009). Target gene specificity of USF-1 is directed via p38-mediated phosphorylation-dependent acetylation. *J Biol Chem* 284, 18851-62.
- Corre, S., Primot, A., Sviderskaya, E., Bennett, D. C., Vaulont, S., Goding, C. R., and Galibert, M. D. (2004). UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J Biol Chem* 279, 51226-33.
- Dotto, G. P. (2000). p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 1471, M43-56.
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-25.

- Fuchs, S. Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X., and Ronai, Z. (1998). Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene* 17, 2543-7.
- Galibert, M. D., Carreira, S., and Goding, C. R. (2001). The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced tyrosinase expression. *EMBO J* 20, 5022-31.
- Gartel, A. L., and Tyner, A. L. (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1, 639-49.
- Gong, W., Russell, M., Suzuki, K., and Riabowol, K. (2006). Subcellular targeting of p33ING1b by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding regulates p21WAF1 expression. *Mol Cell Biol* 26, 2947-54.
- Grill, C., Bergsteinsdottir, K., Ogmundsdottir, M. H., Pogenberg, V., Schepsky, A., Wilmanns, M., Pingault, V., and Steingrimsdottir, E. (2013). *MITF* mutations associated with pigment deficiency syndromes and melanoma have different effects on protein function. *Hum Mol Genet*.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaoja, J., Saluz, H. P., Haenel, F., and Eilers, M. (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* 10, 509-21.
- Hill, R., Bodzak, E., Blough, M. D., and Lee, P. W. (2008). p53 Binding to the p21 promoter is dependent on the nature of DNA damage. *Cell Cycle* 7, 2535-43.
- Itoh, T., and Linn, S. (2005). The fate of p21CDKN1A in cells surviving UV-irradiation. *DNA Repair (Amst)* 4, 1457-62.
- Jiang, P., Du, W., Wang, X., Mancuso, A., Gao, X., Wu, M., and Yang, X. (2011). p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol* 13, 310-6.

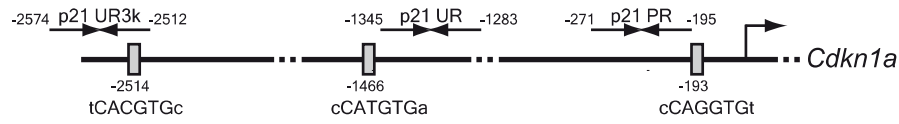
- Jung, H. S., Kim, K. S., Chung, Y. J., Chung, H. K., Min, Y. K., Lee, M. S., Lee, M. K., Kim, K. W., and Chung, J. H. (2007). USF inhibits cell proliferation through delay in G2/M phase in FRTL-5 cells. *Endocr J* 54, 275-85.
- Latonen, L., and Laiho, M. (2005). Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1755, 71-89.
- Lee, H., Zeng, S. X., and Lu, H. (2006). UV Induces p21 rapid turnover independently of ubiquitin and Skp2. *J Biol Chem* 281, 26876-83.
- Lee, J. Y., Kim, H. S., Kim, J. Y., and Sohn, J. (2009). Nuclear translocation of p21(WAF1/CIP1) protein prior to its cytosolic degradation by UV enhances DNA repair and survival. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 1361-6.
- Lee, J. Y., Yu, S. J., Park, Y. G., Kim, J., and Sohn, J. (2007). Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates p21WAF1/CIP1 for proteasomal degradation after UV irradiation. *Mol Cell Biol* 27, 3187-98.
- Lekmine, F., Chang, C. K., Sethakorn, N., Das Gupta, T. K., and Salti, G. I. (2007). Role of microphthalmia transcription factor (Mitf) in melanoma differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 830-5.
- Liu, F., Singh, A., Yang, Z., Garcia, A., Kong, Y., and Meyskens, F. L., Jr. (2010). MITF links Erk1/2 kinase and p21 CIP1/WAF1 activation after UVC radiation in normal human melanocytes and melanoma cells. *Mol Cancer* 9, 214.
- Liu, M., and Pelling, J. C. (1995). UV-B/A irradiation of mouse keratinocytes results in p53-mediated WAF1/CIP1 expression. *Oncogene* 10, 1955-60.
- Liu, M., Wionkal, N. M., and Brash, D. E. (1999). UV induces p21WAF1/CIP1 protein in keratinocytes without p53. *J Invest Dermatol* 113, 283-4.

- Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A. J., and Drobetsky, E. A. (1997). A p53-independent pathway for induction of p21^{waf1/cip1} and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Res* 57, 3390-4.
- Magrini, R., Russo, D., Fronza, G., Inga, A., and Menichini, P. (2007). The kinetics of p53-binding and histone acetylation at target promoters do not strictly correlate with gene expression after UV damage. *J Cell Biochem* 100, 1276-87.
- Maki, C. G., and Howley, P. M. (1997). Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol* 17, 355-63.
- Muller, P. A., and Vousden, K. H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 15, 2-8.
- Murray, S. A., Zheng, H., Gu, L., and Jim Xiao, Z. X. (2003). IGF-1 activates p21 to inhibit UV-induced cell death. *Oncogene* 22, 1703-11.
- Prince, S., Carreira, S., Vance, K. W., Abrahams, A., and Goding, C. R. (2004). Tbx2 directly represses the expression of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res* 64, 1669-74.
- Qi, L., Allen, R. R., Lu, Q., Higgins, C. E., Garone, R., Staiano-Coico, L., and Higgins, P. J. (2006). PAI-1 transcriptional regulation during the G0 --> G1 transition in human epidermal keratinocytes. *J Cell Biochem* 99, 495-507.
- Sestakova, B., Ondrusova, L., and Vachtenheim, J. (2010). Cell cycle inhibitor p21/WAF1/ CIP1 as a cofactor of MITF expression in melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 23, 238-51.
- Soria, G., and Gottifredi, V. (2010). PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: The exception that confirms the rule? *DNA Repair (Amst)* 9, 358-64.

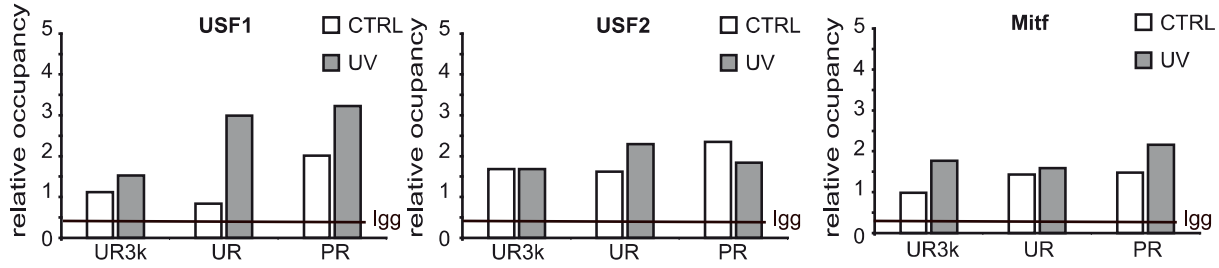
- Tang, D., Wu, D., Hirao, A., Lahti, J. M., Liu, L., Mazza, B., Kidd, V. J., Mak, T. W., and Ingram, A. J. (2002). ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* 277, 12710-7.
- Vallet, V. S., Casado, M., Henrion, A. A., Bucchini, D., Raymondjean, M., Kahn, A., and Vaulont, S. (1998). Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose. *J Biol Chem* 273, 20175-9.
- Wang, J., Devgan, V., Corrado, M., Prabhu, N. S., El-Deiry, W. S., Riccardi, C., Pandolfi, P. P., Missero, C., and Dotto, G. P. (2005). Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor is a p21Cip1/WAF1 transcriptional target conferring resistance of keratinocytes to UV light-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280, 37725-31.
- Wang, W., Furneaux, H., Cheng, H., Caldwell, M. C., Hutter, D., Liu, Y., Holbrook, N., and Gorospe, M. (2000). HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol* 20, 760-9.
- Wani, M. A., Wani, G., Yao, J., Zhu, Q., and Wani, A. A. (2002). Human cells deficient in p53 regulated p21(waf1/cip1) expression exhibit normal nucleotide excision repair of UV-induced DNA damage. *Carcinogenesis* 23, 403-10.
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. (1994). Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol* 14, 8058-70.
- Zhan, Q., Carrier, F., and Fornace, A. J., Jr. (1993). Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Mol Cell Biol* 13, 4242-50.

Figure 1

A



B



C

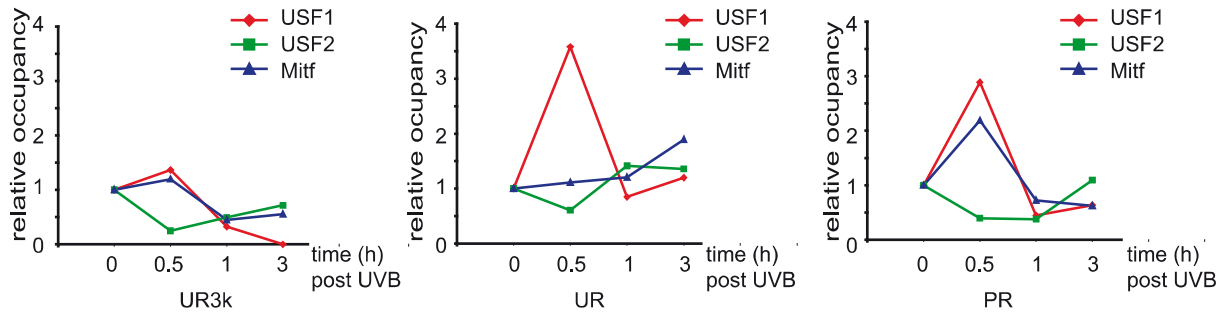


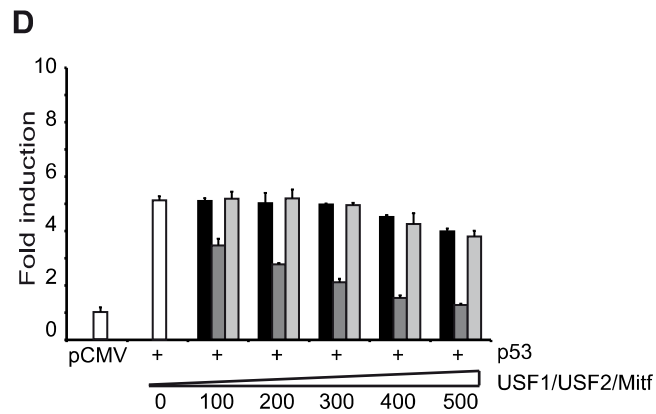
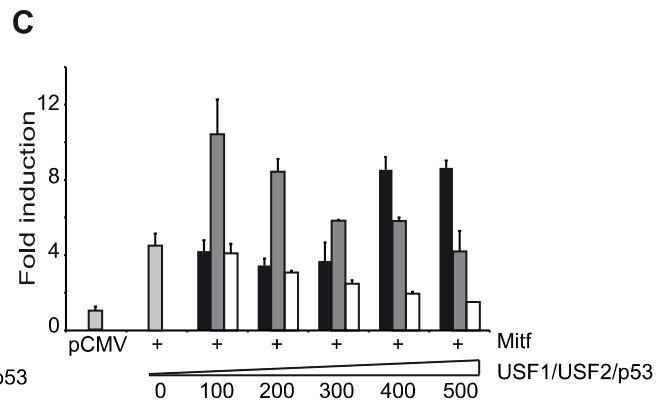
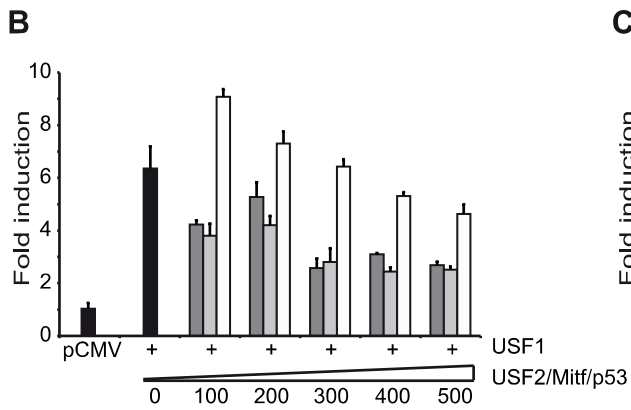
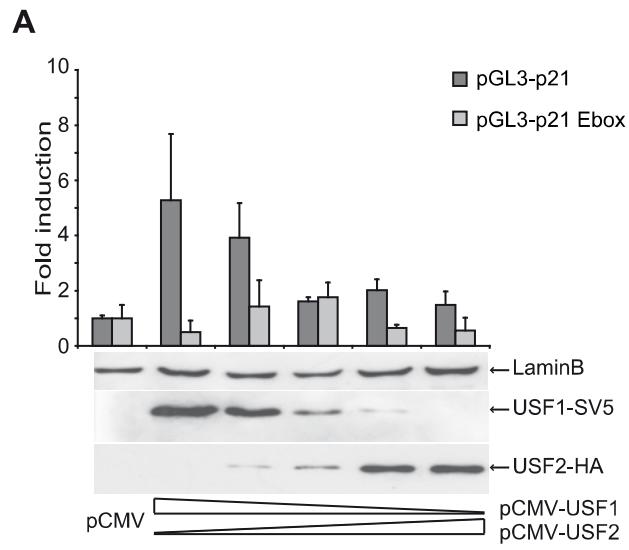
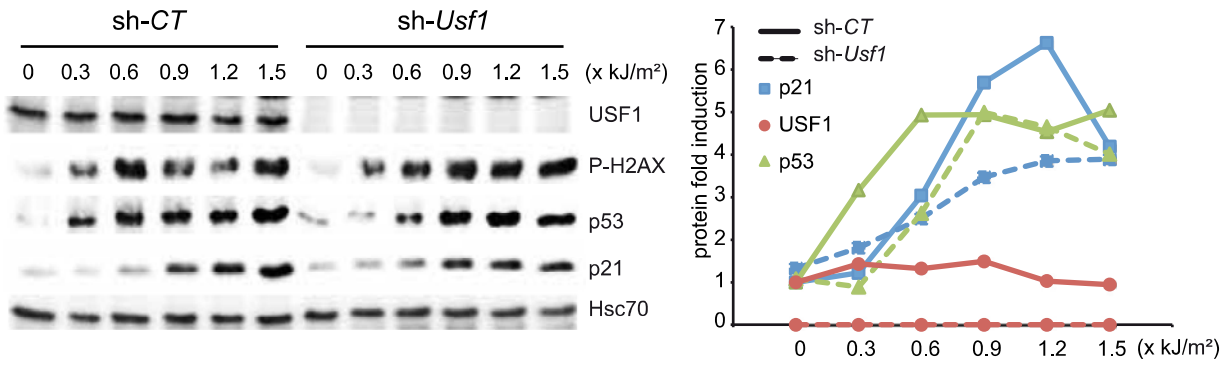
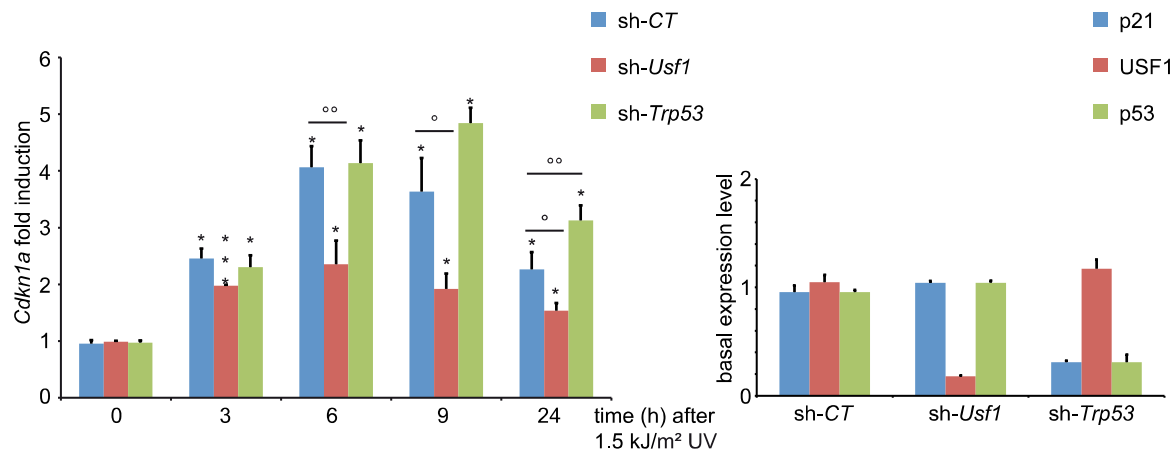
Figure 2

Figure 3

A



B



C

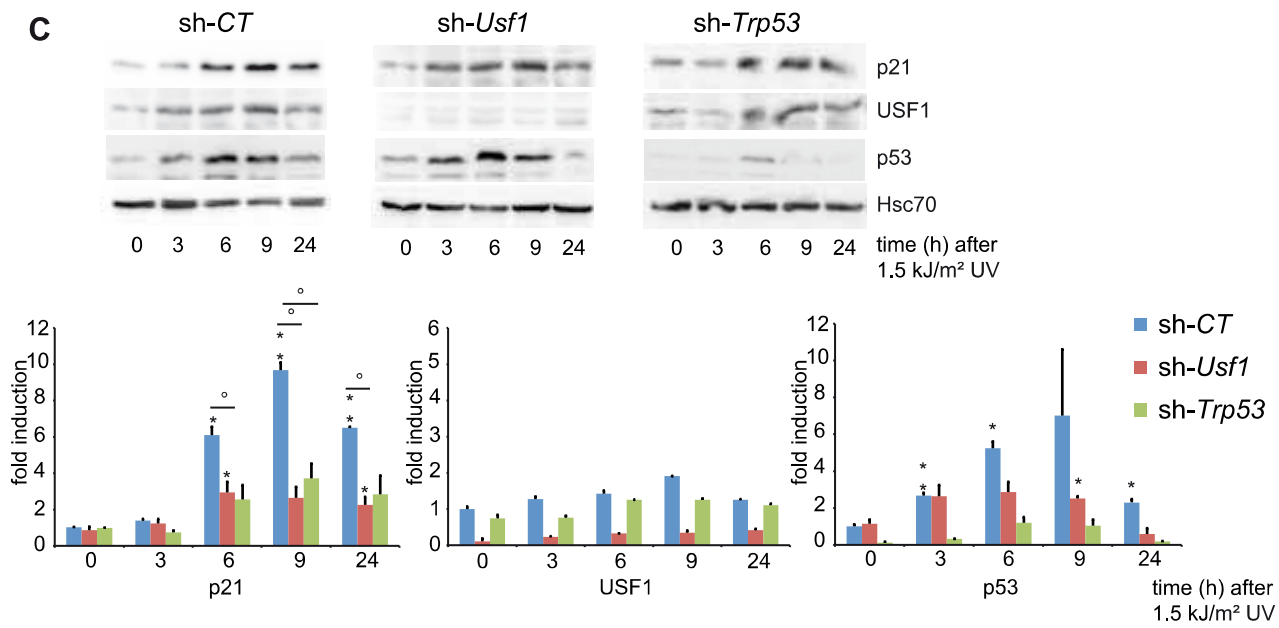


Figure 4

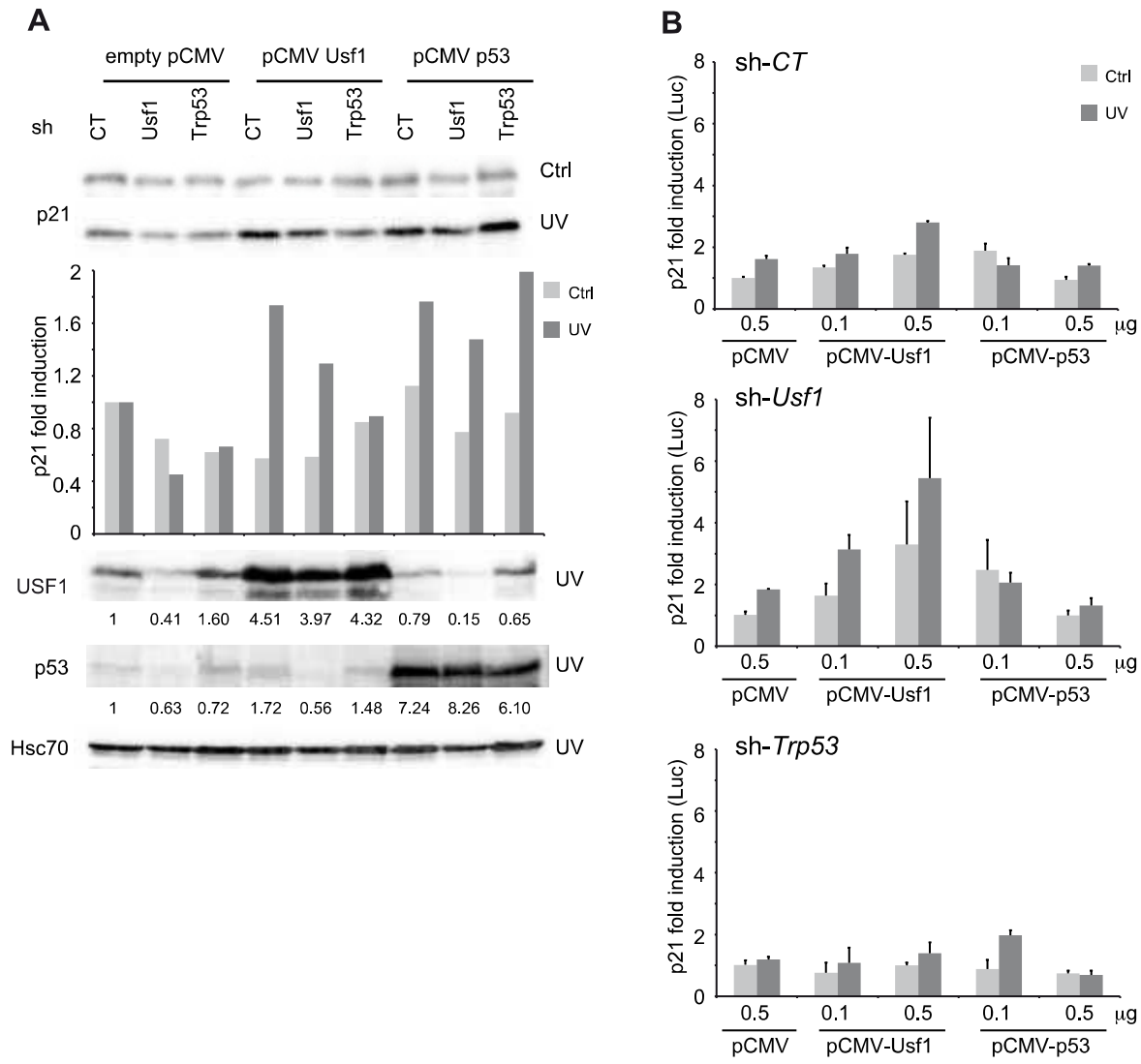


Figure 5

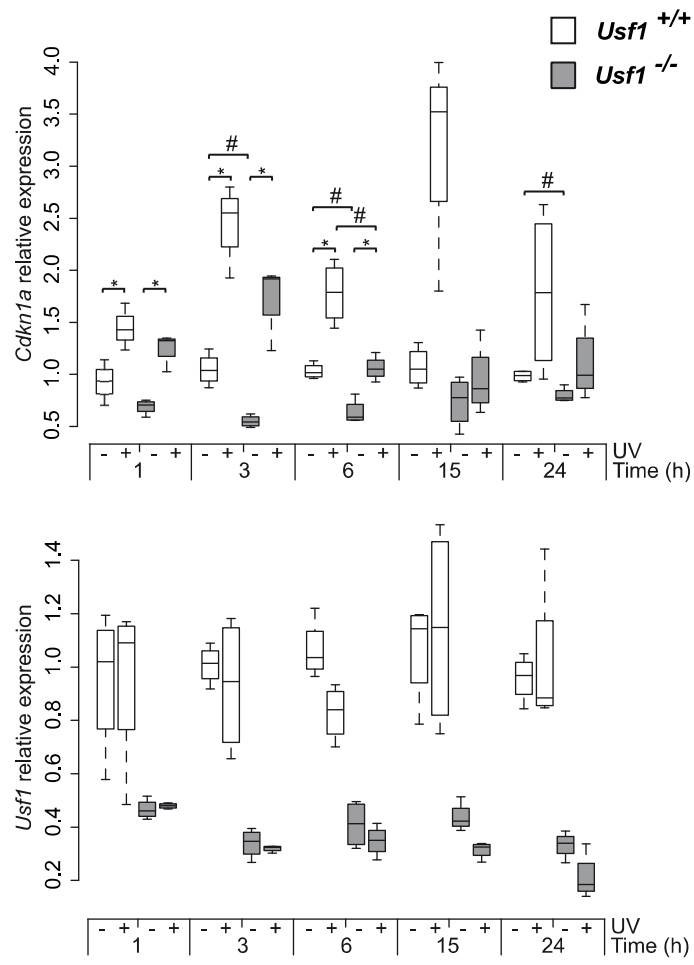


Figure 6

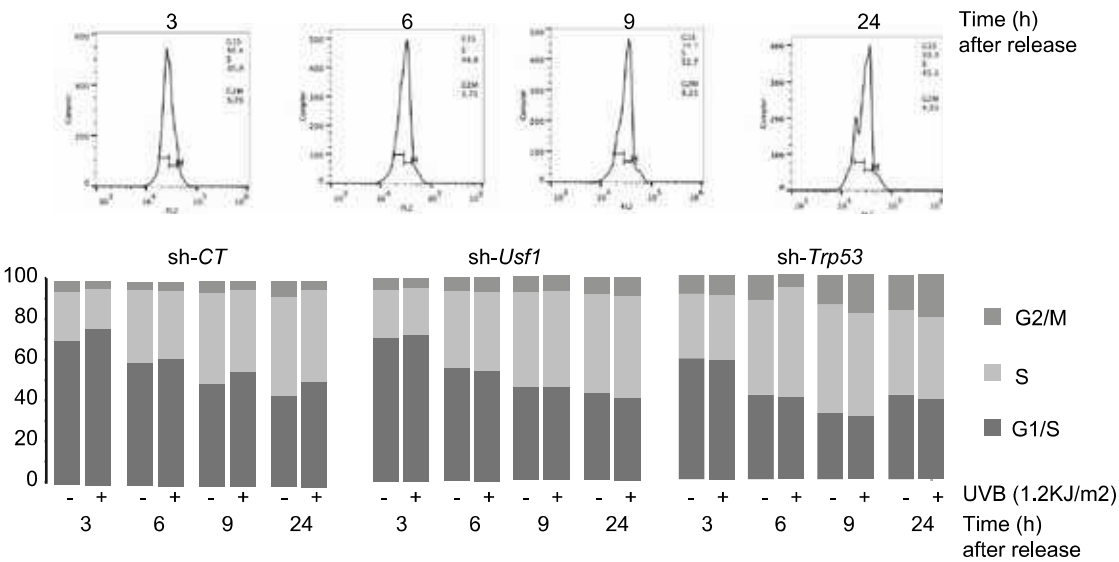


Figure 7

low dose and early response

high dose and late response

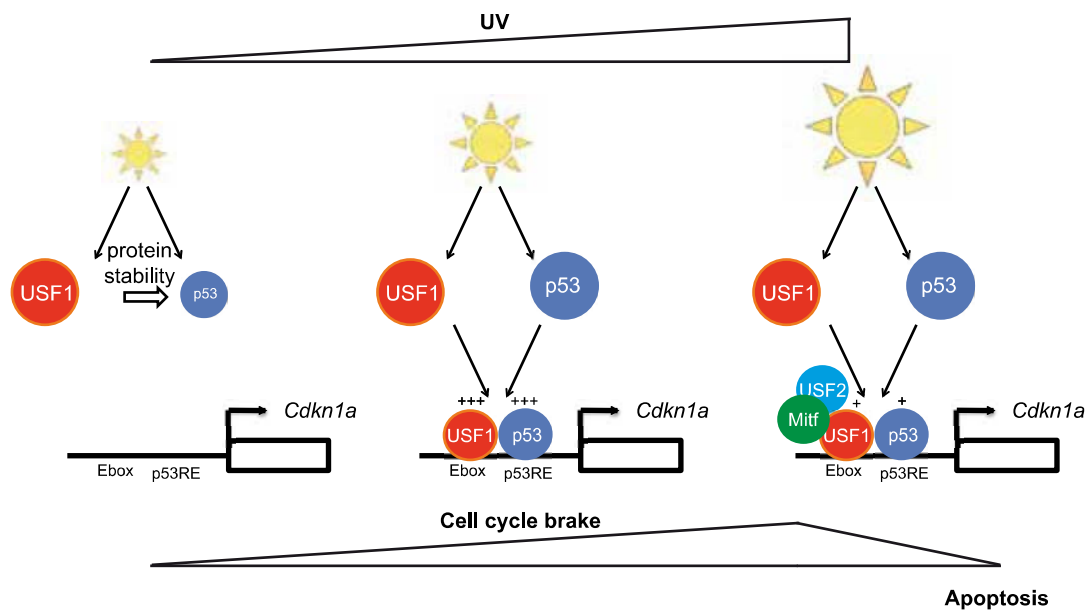


Figure 8

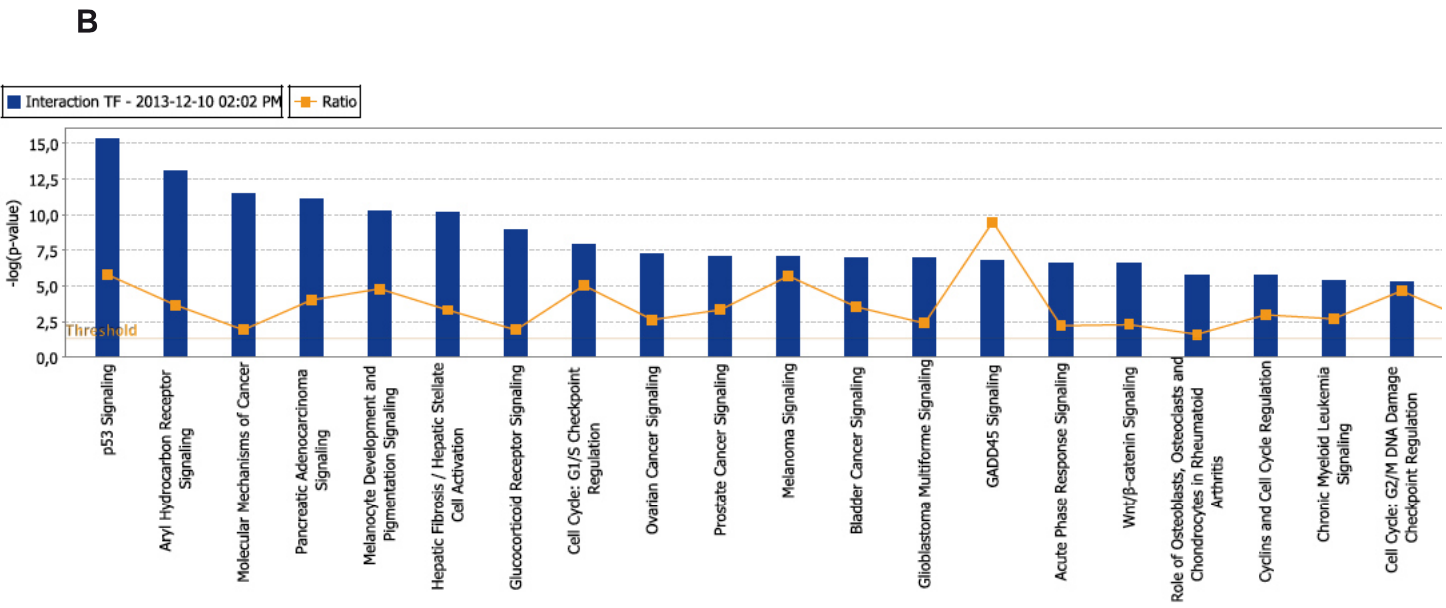
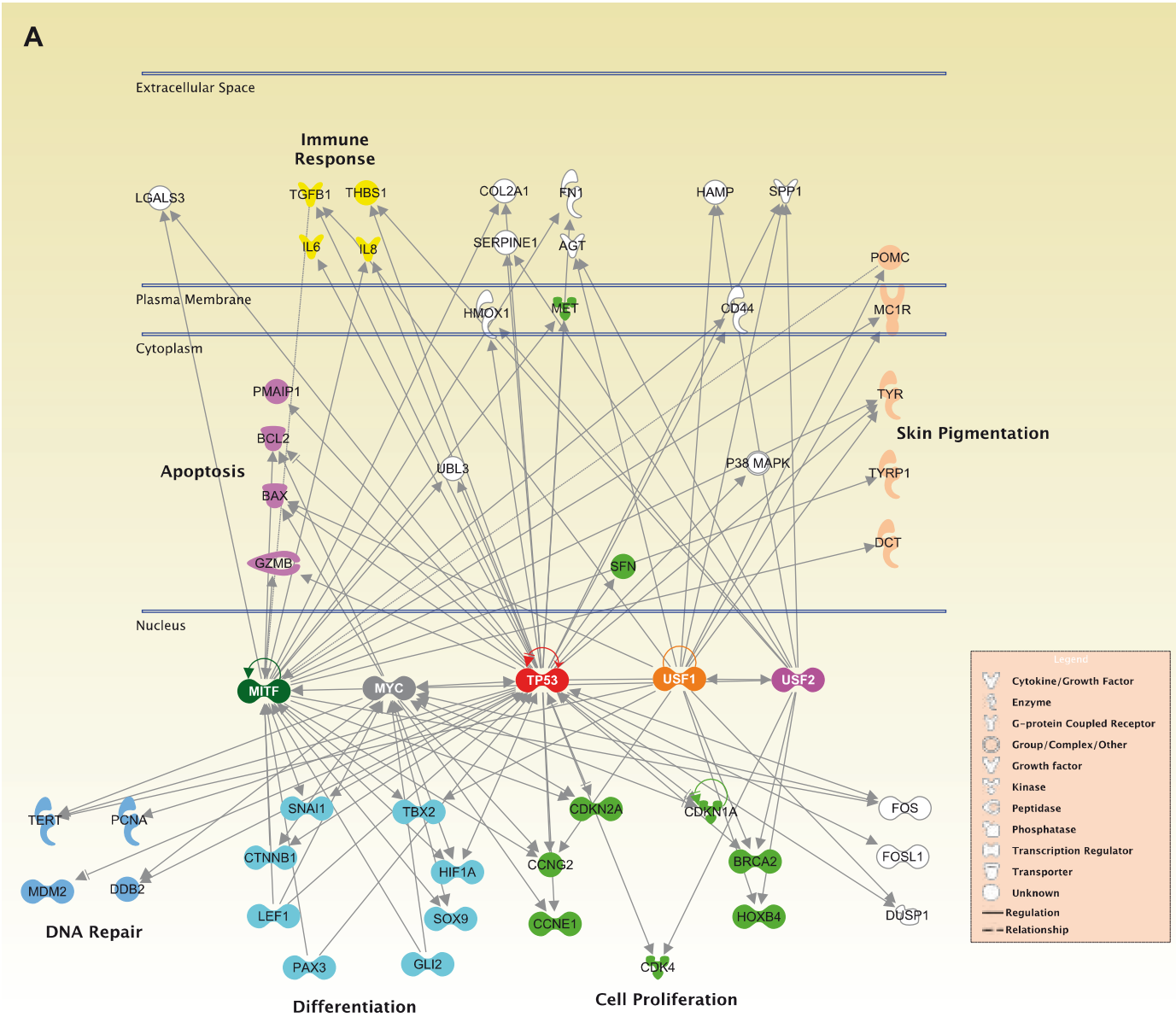


Figure S1

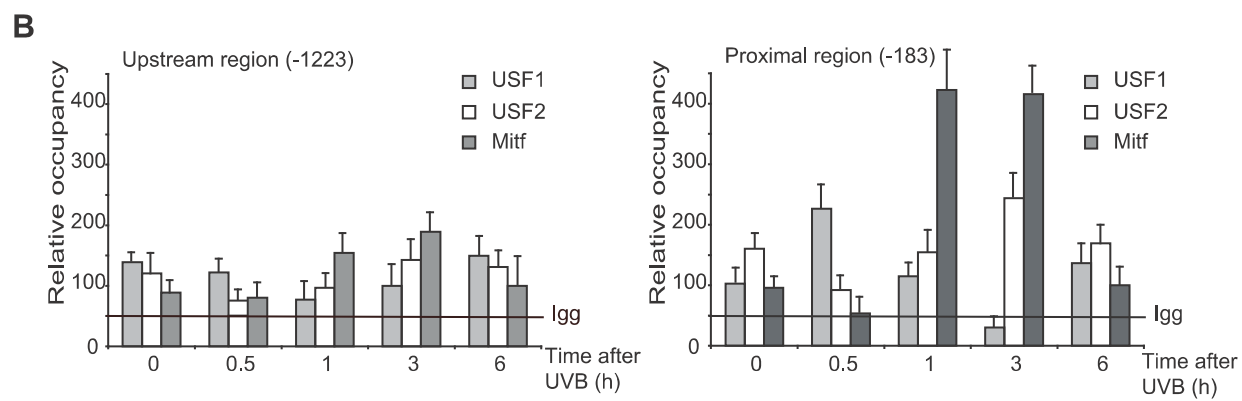
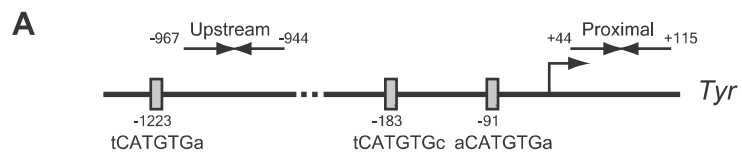


Figure S2

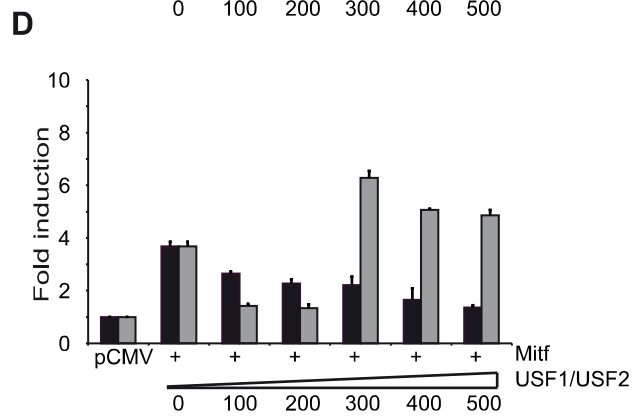
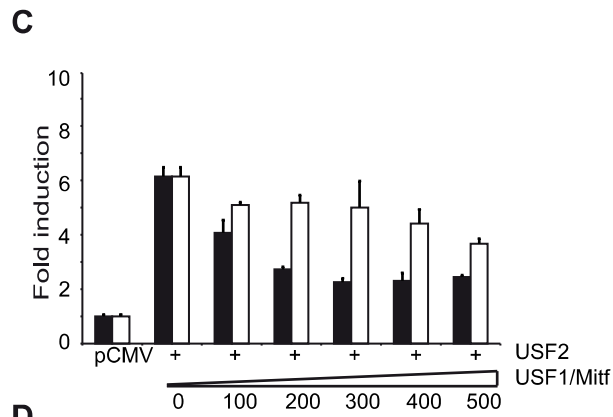
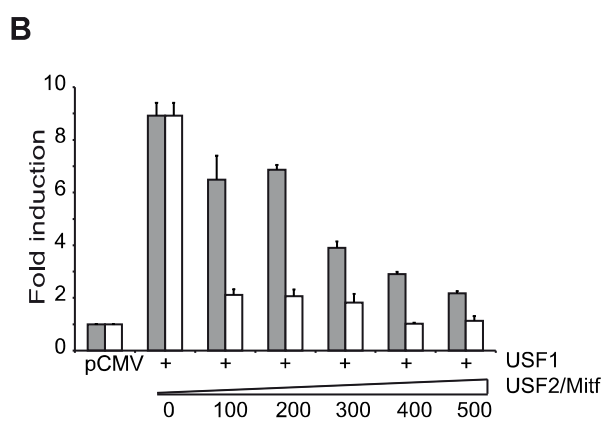
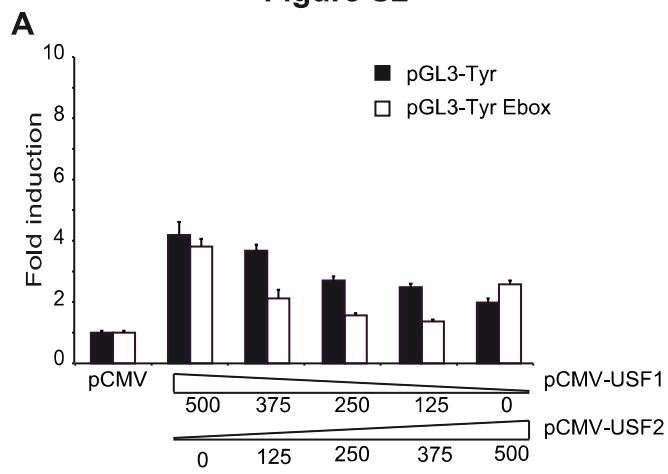
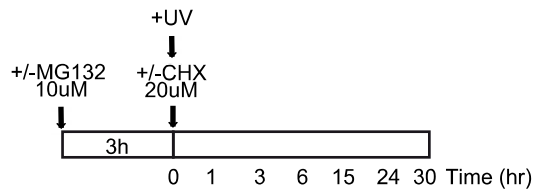


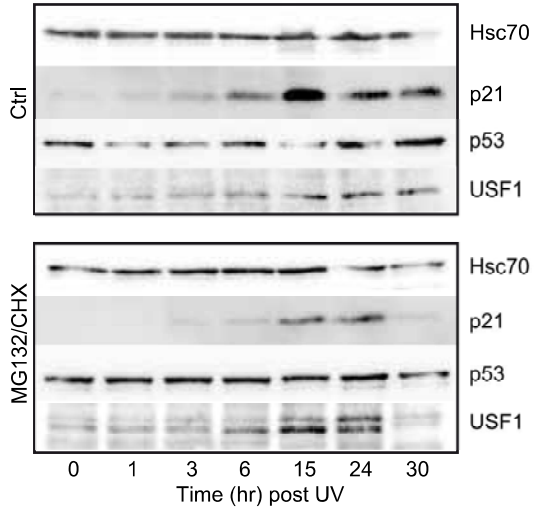
Figure S3

A



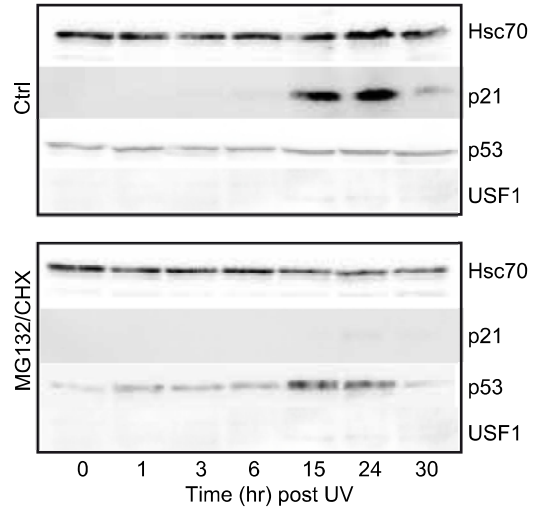
B

sh-CT



C

sh-Usf1



2.1.3. Résultats supplémentaires, Identification des réseaux transcriptionnels contrôlés par la protéine USF1 en réponse à l'exposition UV

La réponse transcriptionnelle des cellules cutanées induite à la suite de l'exposition UV est complexe, et particulièrement dépendante de la cinétique dans laquelle elle est observée. Ainsi, les études transcriptionnelles menées chez l'Homme ou dans les modèles murins en réponse précoce à l'exposition UV montrent une modulation prépondérante de gènes cibles de p53 [156,290,361,591,592]. Cependant, les régulations de la protéine p53 et de ces cibles transcriptionnelles sont particulièrement influencées par d'autres facteurs de transcription associés au stress et agissant comme co-régulateurs de la réponse UV.

Parmi ces facteurs, nous avons montré qu'USF1 peut agir précocement en réponse aux UV sur la réponse transcriptionnelle globale de façon indirecte, en régulant post-traductionnellement p53 (Bouafia, Corre et *al.*, 2014, en révision) et/ou, directement sur des gènes cibles de p53 comme *CDKN1A* (*p21Waf1/Cip1*) (Corre, Bouafia et *al.*, 2014, en cours de soumission). De façon importante, USF1 est un facteur de transcription de type bHLH-LZ qui a été mis en évidence dans le contrôle des gènes de la pigmentation dans le mélanocyte et plus largement dans le contrôle de gènes intervenant dans le NER dans le tissu cutané murin exposé aux UV [186,187,226,357,360]. Plusieurs études mettent en évidence que l'activité stress dépendante du facteur de transcription USF1 est médiée par une variété de kinases de stress qui lui permettent d'implémenter les différents types de stimuli environnementaux. En réponse aux UV, il a particulièrement été montré que la kinase p38 α , modulée par les UV, était importante pour activer le facteur USF1 et la transcription de ces gènes cibles [186,187,357,360].

Au vue de nos résultats précédents et du lien fonctionnel entre les protéines USF1 et p53, nous avons voulu évaluer l'influence générale de la voie p38 α -USF1 sur la réponse transcriptionnelle du tissu cutané exposé aux UV. Pour cela, nous avons entrepris une étude sur puce microarray de type "whole genome". Celle-ci a été menée à partir de biopsies cutanées murines issues de régions dorsales exposées ou non à une dose correspondant à environ 1 DEM (Dose Erythémale Minimale) en composante UVB (**Figure 24A**). Cette analyse a été menée 5h post exposition sur des souris sauvages ou invalidées pour *Usf1*. Il est à noter que deux séries de puce ont été réalisées et nous ne présenterons ici que les résultats de la première série d'analyse. En effet, la deuxième série, réalisée pour augmenter la puissance statistique de l'étude, est actuellement en cours d'analyse. D'autre part, nous avons également réalisé une partie de la validation des transcrits dont la modulation est influencée par USF1 par l'usage de culture organotypique en présence ou non de SB203580, un inhibiteur de la kinase de stress p38 α .

2.1.3.1. Le transcriptome des souris invalidées pour USF1 révèle une altération de la réponse globale aux UV et de plusieurs gènes cibles de p53

Une première étape de notre étude a visé à valider nos protocoles *in vivo* d'irradiation UVB des tissus cutanés murins en vue de leurs analyses par puces transcriptomiques (**Figure 24A**). Nous avons d'abord caractérisé que les deux types de souris (*Usf1* KO et *Usf1* WT) ne présentaient aucune différence significative en terme d'épaisseur d'épiderme et de pigmentation constitutive (**Article 1 et Annexe n°1**). Dans ce cadre nous avons contrôlé par immunohistologie que l'exposition UV, indépendamment du génotype, produisait effectivement des dommages à l'ADN avec une intensité comparable dans les deux types de génotypes (**Figure 24B**). Néanmoins et conformément aux résultats précédemment publiés par notre laboratoire [²²⁶], nous avons identifié la maintenance d'un niveau plus élevé de dommages à l'ADN dans les souris invalidées pour *Usf1* 5h post irradiation UVB. Dans ce contexte, nous avons également contrôlé l'activation du marqueur de dommages à l'ADN, γ -H2AX, qui nous a permis de sélectionner les tissus cutanés de trois souris pour chaque génotype (**Figure 24C**).

L'analyse supervisée des transcrits modulés dans chaque génotype murin exposé ou non à une dose d'UVB de 5kJ/m² nous a permis de mettre en évidence un nombre de gènes différentiellement modulés variable entre les deux types de souris (**Figure 25**). Chez les souris *Usf1* KO, nous avons observé que seulement 30 gènes avec une variation supérieure ou inférieure à 1,2 par rapport aux contrôles (fold induction) étaient modulés en réponse à l'exposition UV. De manière significativement différente ($p < 0,05$, non corrigée), l'exposition UV provoque chez les souris *Usf1* WT la modulation de 404 gènes (**Figure 25A et B**). L'annotation fonctionnelle des listes de gènes modulés par l'exposition UV montre des processus liés à la mort cellulaire et à la régulation du métabolisme énergétique basal pour les souris *Usf1* KO. Chez les souris WT, et de manière plus attendue, les gènes modulés interviennent dans le contrôle du cycle, la réparation de l'ADN et l'inflammation (**Figure 25B**).

De façon intéressante, nous avons observé que 10 gènes dont l'expression est altérée à l'état basal par la perte d'USF1 sont requis dans la réponse à l'exposition UVB chez les souris WT. Indépendamment de l'état basal, nous avons également identifié que le niveau d'expression de 119 gènes dans les échantillons de peaux irradiées des souris des deux génotypes présentent une amplitude supérieure ou inférieure à un fold de 1,2 significativement différent ($p < 0,05$, non corrigé). Parmi ces gènes, 38 sont modulés en réponse à l'exposition UV uniquement chez les souris WT. Au total, ces 48 gènes représentent des cibles nécessaires à l'exposition UV et sont potentiellement affectées par la perte d'USF1.

Afin d'être relevant quant au choix et à la validation de ces 48 cibles potentielles d'USF1, nous avons également croisé les listes de gènes différentiellement régulés par les UVB chez les souris, avec celles précédemment publiées par notre laboratoire sur des plasties abdominales humaines exposées à différentes doses d'UV solaires artificiels (**Figure 25C**) [³⁶¹]. Nous avons pu mettre en évidence que 10% de gènes répondant à l'exposition UV dans le modèle murin, particulièrement les souris *Usf1* WT, étaient également requis dans le tissu cutané humain (**Figure 25C**). Plus de la moitié de ces gènes (58%) sont exprimés différentiellement entre les

souris des deux génotypes en réponse à l'exposition UV. Ainsi parmi les 48 gènes identifiés comme cibles potentiels d'USF1 dans le tissu cutané murin, nous en avons retenu 28 qui interviennent également dans le tissu cutané humain. Au total, ces 28 gènes (**Tableau III**) peuvent être nécessaires à la réponse à l'exposition UV chez l'Homme et chez la souris et, USF1 apparaît comme vraisemblablement important à leur régulation.

Parmi les 28 gènes dépendants des UV, nous avons validé par PCRq 12 gènes intervenant majoritairement dans le contrôle du cycle et la réparation de l'ADN dont l'expression est significativement affectée par la perte d'USF1 (**Figure 26A**). Ces gènes particulièrement *SFN* (14-3-3 sigma), *CDKN1A*, *Sertad1*, *Hexim1* et *PCNA*, ont été associés à la réponse au stress et à la voie p53. De façon intéressante, *SFN*, *CDKN1A* et *PCNA* sont des cibles transcriptionnelles de p53 [211,454,470,493,494,583,593,594] et, les protéines codées par les gènes *Sertad1* et *Hexim1* sont des régulateurs de la stabilité de p53 [595,596]. D'autres gènes dont la régulation est influencée par USF1 et avec des fonctions plus pléiotropiques, ont également été découverts comme *FZD5* [597], *CEBPB* [534] et *H2AX* [598]. Ces résultats suggèrent que la perte d'USF1 impacte la voie p53 en jouant potentiellement sur les régulateurs en amont du suppresseur de tumeur mais également sur ces cibles transcriptionnelles.

Afin de valider la dépendance de ces gènes à USF1, nous avons réalisé des tests d'exposition aux UVB de cultures organotypiques de peau de souris après les avoir traitées par du SB203580, un inhibiteur de la kinase p38 α . La kinase p38 α régulant l'activité transcriptionnelle d'USF1 [186], nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition de cette kinase nous renseignerait sur les gènes dépendant de la voie p38-USF1. Précocement après l'exposition UV (3h post UV), nous avons observé une double sensibilité à la perte d'USF1 et à l'inhibition de la kinase p38 α significative pour les gènes *SFN*, *CDKN1A*, *Sertad1* et *PCNA* (**Figure 26B**). En revanche, nous avons observé des gènes uniquement sensibles à la perte d'USF1 comme *FZD5* et *H2AX*. Certaines disparités avec les résultats *in vivo* ont également été observées, particulièrement pour le gène *Hexim1* dont la sensibilité à la perte d'USF1 n'a pu être reproduite 3h post exposition UVB (**Figure 26B**). Dans ce contexte, nous avons contrôlé la validité de nos expériences sur des gènes dépendants des UV et sensibles au SB203580 comme *HBEGF* précédemment publiés par notre laboratoire [361]. Collectivement, ces résultats suggèrent que la voie p38-USF1 peut être impliquée dans la régulation transcriptionnelle des gènes *SFN*, *CDKN1A*, *Sertad1* et *PCNA*. Ils indiquent également qu'USF1 peut avoir une influence sur la transcription de gènes comme *FZD5* et *H2AX* indépendamment de la voie p38 α (**Figure 26B**). En conclusion de cette étude préliminaire, nous avons identifié que la perte d'USF1 affectait drastiquement la réponse transcriptionnelle dépendante des UV dans le modèle murin. De plus nous avons identifié qu'USF1, en plus d'agir sur la stabilité de p53, pouvait très probablement intervenir dans la co-régulation transcriptionnelle des gènes cibles du suppresseur de tumeur.

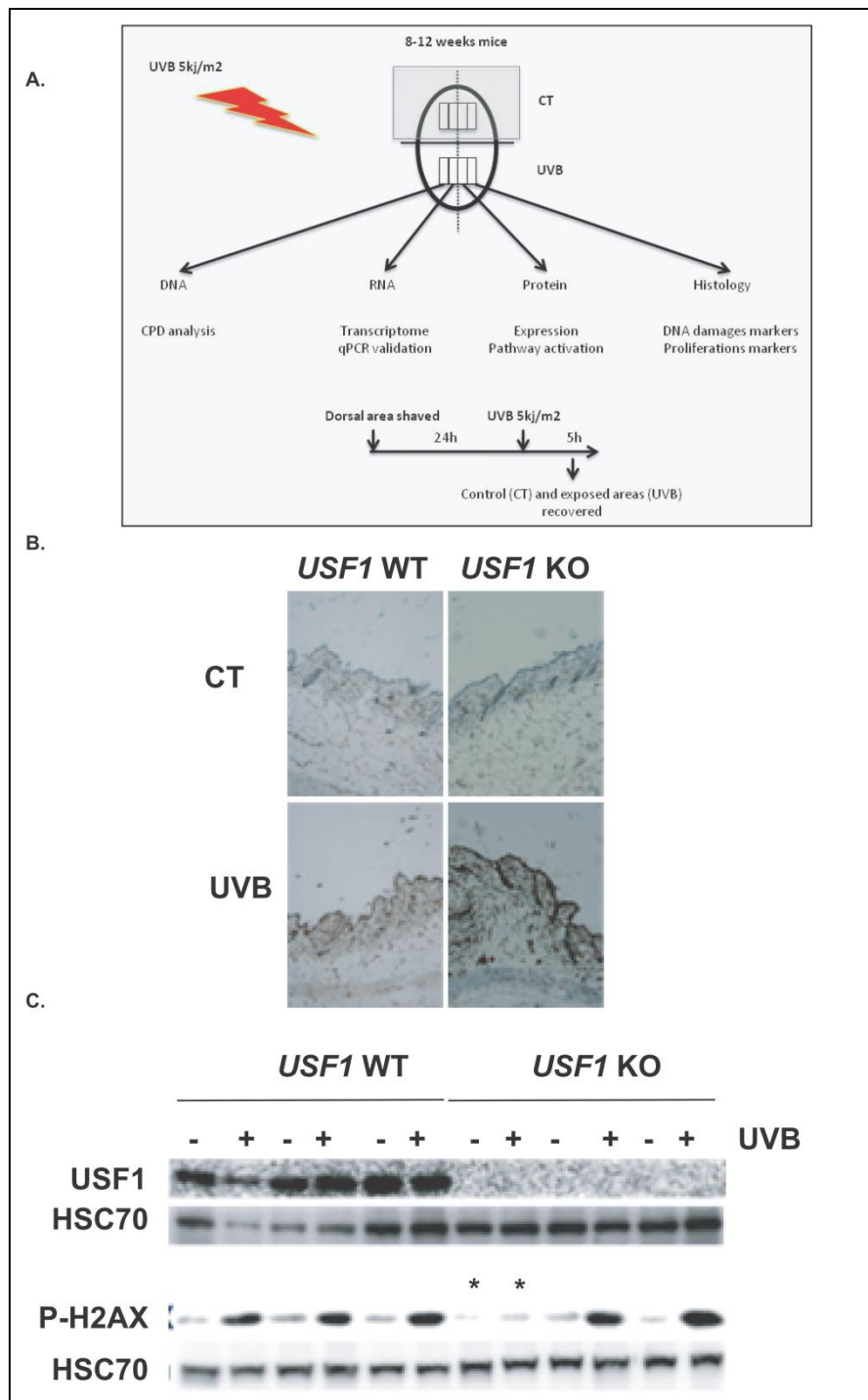


Figure 24 : Résultats supplémentaires n°1, choix et pré-validations des échantillons cutanés en vue de l'analyse transcriptomique de la réponse des souris *Usf1* KO à l'exposition UVB.

A. Schéma représentant le mode d'exposition de la peau des souris aux UVB et l'échantillonnage réalisé en vue de l'analyse histologique et moléculaire. B. Coupes immunohistologiques représentatives montrant l'effet de l'exposition UVB sur la formation de lésions à l'ADN de type CPD. C. Analyse par western blot de l'activation du marqueur de dommages à l'ADN phospho-H2AX dans le tissu cutané des souris exposées aux UVB. (Les ** représentent les échantillons exclus de l'analyse transcriptomique).

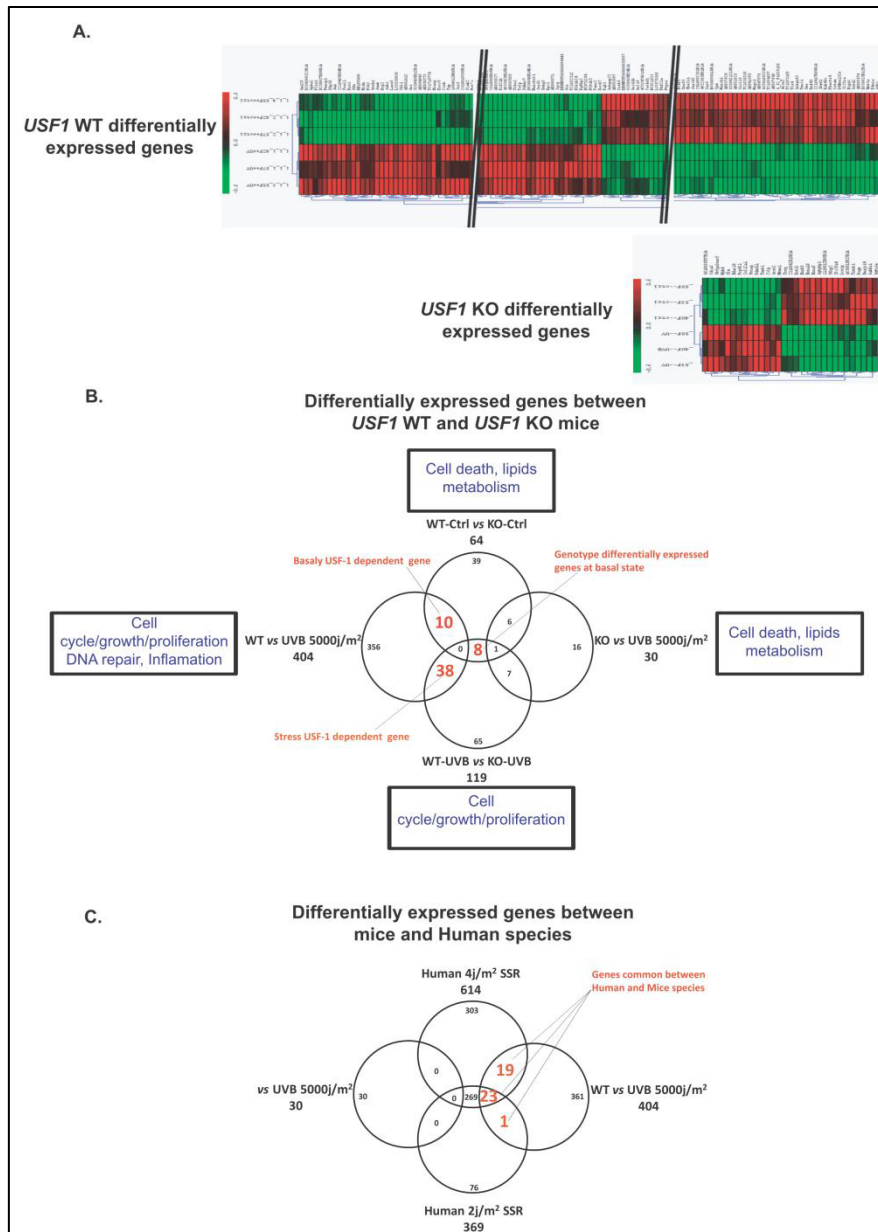


Figure 25 : Résultats supplémentaires n°2, analyse par microarray des gènes différentiellement exprimés dans le tissu cutané des souris sauvages et invalidées pour *Usf1* exposé aux UVB.

A. "Heat Map" représentant les résultats de l'analyse supervisée des gènes différentiellement modulés en réponse à l'exposition UV dans les souris des deux génotypes. L'analyse statistique a été réalisée à partir d'un test de Student non corrigé et les gènes avec une induction supérieure ou inférieure à 1,2 par rapport aux contrôles respectifs ont été conservés. B. Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes modulés par génotype, entre génotype et à l'intersection des deux génotypes. Les fonctions cellulaires associées aux listes de gènes différentiels ont été tirées après soumissions aux programmes David et Ingenuity (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>, <http://www.ingenuity.com/products/ipa>). C. Diagramme de Venn comparant les gènes régulés en réponse aux radiations UV chez l'Homme précédemment publiés par notre laboratoire [³⁶¹] avec ceux de l'étude sur les modèles murins invalidés ou non pour le gène *Usf1*.

Cell cycle control	Fonction
CDKN1A SERTAD1 HEXIM1	CKI, blocks of S progression Transcription factor, enhances E2F transcriptional activity Sequestration complexe for P-TEFB (Cycl T1-CDK9), regulation of p53 activity
Survival	Fonction
SFN	Pro-survival factor by sequestration of BAD
DNA repair	Fonction
PCNA H2AFX	Processivity factor, repair proteins scaffold Histone, scaffold for DNA repair proteins
Apoptose/Autophagy	Fonction
TBC1D14	Negative regulator of autophagosome formation
Inflammation	Fonction
IL28RA	Interferon lambda receptor
Transcription and post-transcription control	Fonction
SFRS6 KLF5 GATA3 RXRA FOXJ3 PARD3 ARID5A ARID2	Splice factor Transcription factor Transcription factor Transcription factor Transcription factor Transcription factor Transcription factor Subunit of the PBAF chromatin-remodeling complex
Traduction	Fonction
IIF5A	translational elongation
Enzymes	Fonction
MAT2A VAV3 MAP2K4	Catalyse of S-adenosylmethionine, the main source of methyl, activation of LT cells Guanine nucleotide exchange factors JNK activator kinase
Ubiquitin proteasome	Fonction
UBE2S FBXW7	Ubiquitine ligase activity (complexe APC/C UBCH10/5), promotes exit from mitosis Ubiquitine ligase, negatively regulates G1-S entry targeting CyclE/CDK2
Membrane	Fonction
FZD5 Grasp EPN2	Receptor for the Wnt5A ligand Scaffold protein Endocytosis component
Other	Fonction
Nol5A GT2FIRD1 JMJD2C BCAR3 RAB40C	Unavalable OMIM Unavalable OMIM Unavalable OMIM Unavalable OMIM Unavalable OMIM

Tableau 3 : Résultats supplémentaires n°3, gènes communs chez l'Homme et la souris en réponse à l'exposition UVB.

La fonction des différents gènes a été tiré de l'analyse par les programmes David, Ingenuity et l'interrogation de la base de donnée OMIM (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>, <http://www.ingenuity.com/products/ipa> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>).

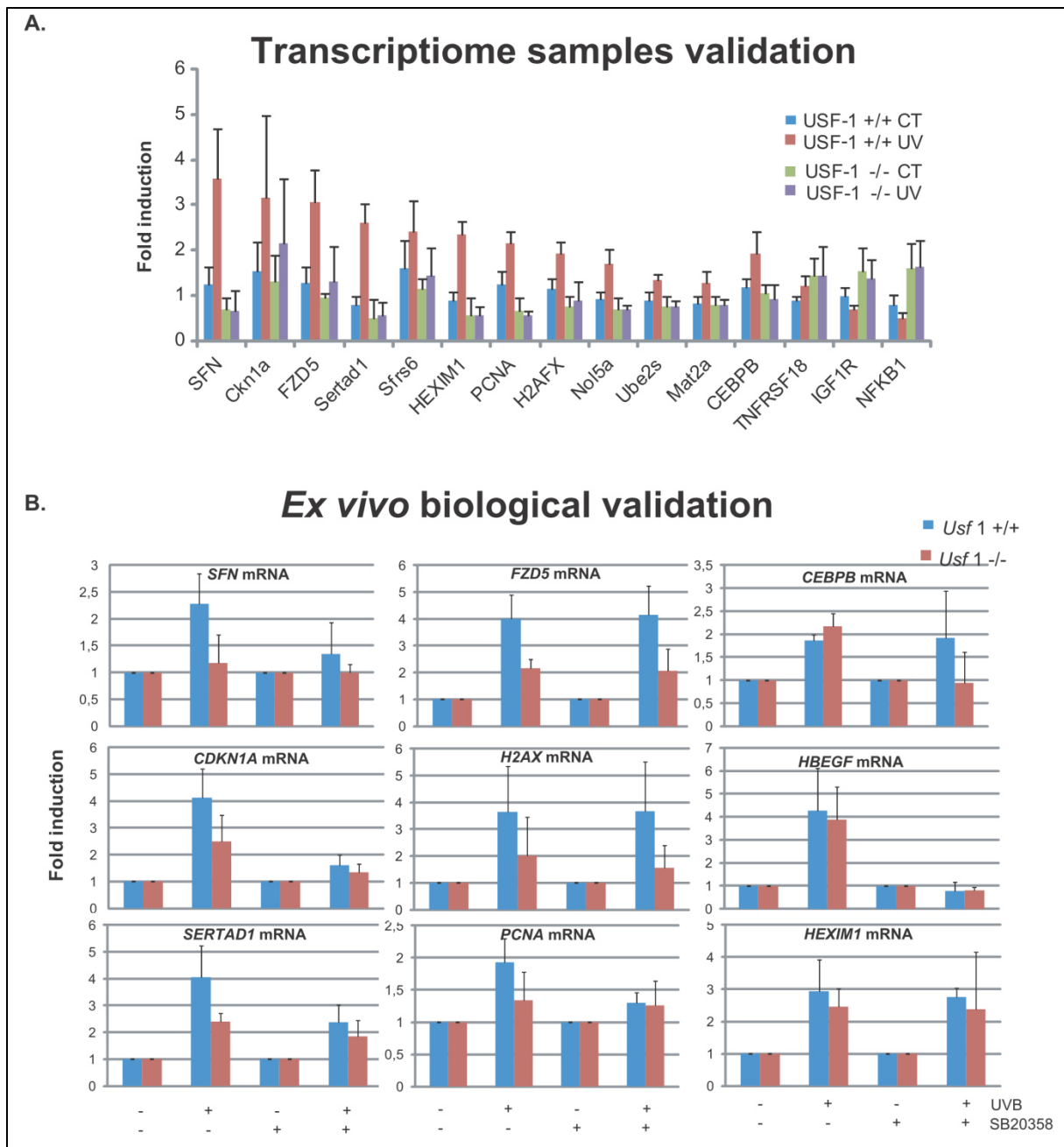


Figure 26 : Résultats supplémentaires n°4, validation des transcrits modulés en réponse à l'exposition UVB dans les souris sauvages ou invalidées pour USF1.

A. Analyse par RT-PCRq des transcrits communs à l'Homme chez les souris sauvages ou invalidées pour *Usf1*. L'analyse inclut également des gènes spécifiques au modèle murin dont : *CEBPB*, *TNFRSF18*, *IGF1R* et *NFKB1*. B. Analyse de la sensibilité à la perte d'USF1 et à l'inhibition de la kinase p38 α par le SB203580 des cultures organotypiques de tissu cutané murin exposé ou non aux UVB et récupéré 3h après exposition. L'ARNm *HBEGF* a été inclus comme témoin positif de l'effet des UVB dans les deux types de souris et comme témoin de l'effet de l'inhibiteur SB203580 [361].

3. Discussion et perspectives

3.1. Mise en évidence d'une coopération entre les voies de réponse au stress USF1 et p53 dans la régulation fine du cycle cellulaire en réponse à l'exposition UVB

Nos travaux montrent pour la première fois que le facteur USF1 est essentiel dans l'arrêt transitoire du cycle cellulaire nécessaire à la prévention de l'instabilité génomique induite par les UVB. Ce processus engage deux fonctions d'USF1 qui semblent mobilisées selon l'intensité du stress UVB (**Figure 27**). A des doses modérées d'UVB, USF1 par interaction physique avec p53 interfère dans la dégradation de p53 médiée par MDM2 et permet à p53 d'activer ses cibles transcriptionnelles. A des doses élevées d'UVB, USF1 coopère avec p53 dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles du suppresseur de tumeur.

3.1.1. La régulation de p53, une nouvelle fonction d'USF1 nécessaire à la prévention de l'instabilité génomique induite par les doses physiologiques d'UVB

Jusqu'à maintenant, le seul lien direct existant entre USF1 et p53 était de nature transcriptionnelle. Ainsi, le groupe de Reisman mettait en évidence *in vitro* que l'occupation et l'activation du promoteur minimal du gène *TP53* par USF1 était nécessaire à l'expression basale de p53 [^{444,445}]. Dans les modèles cutanées murins exposés aux UVB nous avons exclu ce type de régulation, conformément aux nombreuses données montrant que p53 est régulé majoritairement de manière post-traductionnelle en réponse au stress UV [^{429,430}]. D'autres parts, nous avons montré que des formes mutantes d'USF1 tronquées sur les domaines responsables de la l'activité transcriptionnelle intrinsèque de la protéine USF1 étaient capables de stabiliser et d'activer p53 (**Article 1**). Au niveau mécanistique, nous avons montré que la stabilisation de p53 par USF1 faisait intervenir la fixation d'USF1 à p53. Celle-ci apparaissant en réponse au stress UV contrecarre la fixation de MDM2 au suppresseur de tumeur de manière mutuellement exclusive. En contraste avec les données suggérant que les UV sont capables de moduler la transcription et la stabilité de MDM2 [³⁸²⁻³⁸⁵], nous n'avons pu identifier de manière significative la fonctionnalité de ces deux types de mécanismes dans nos modèles d'études. Cela peut être expliqué par les doses modérées d'UV et les cinétiques précoces dans lesquelles nous avons analysées l'arrêt transitoire du cycle s'effectuant en réponse à l'exposition UVB. Dans ce sens il a été montré que les régulations négatives, transcriptionnelles et/ou post-traductionnelles, de MDM2 s'opéraient à de fortes doses d'UV et de manière indépendante de p53 [⁴⁶⁹⁻⁴⁷¹]. Ces observations ainsi que les nôtres suggèrent qu'USF1 est associé à la stabilisation de p53 indépendamment de la régulation de MDM2. En revanche, nous n'excluons pas, conformément à la littérature, que la neutralisation de l'activité de p53 par le biais de la transcription

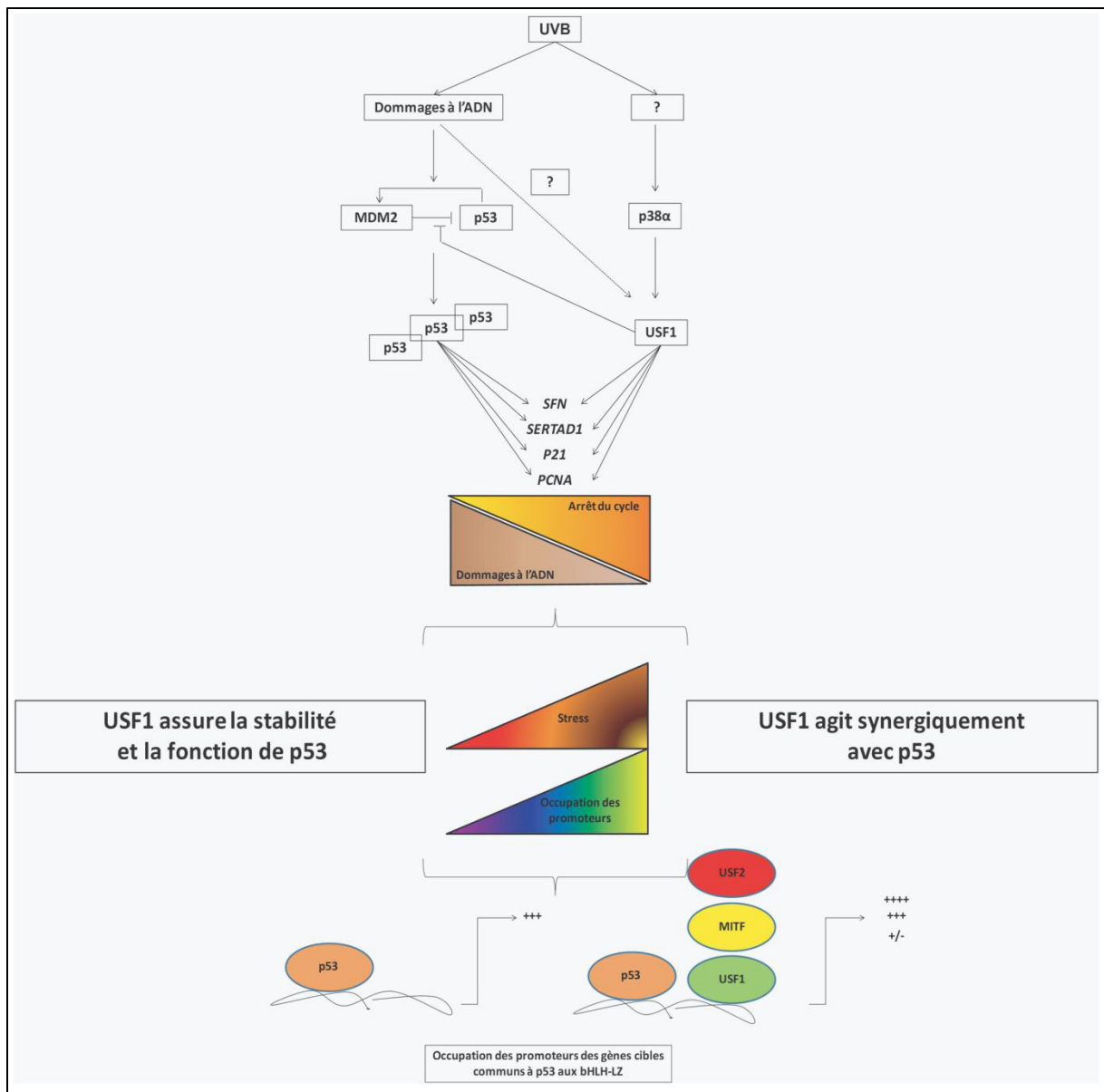


Figure 27 : Schéma de synthèse sur l'interaction potentielle des voies USF1 et p53 en réponse aux effets délétères de l'exposition UVB.

tardive de *MDM2* en réponse à doses modérées d'UV ne puisse également mobiliser USF1 [³⁸²⁻³⁸⁵].

Notre étude montre de manière claire que le stress UV promeut l'association physique entre USF1 et p53. Si nous avons mis en évidence que cette fixation était dépendante des UV, nous n'avons encore aucune connaissance sur les voies en amont d'USF1 qui favorisent cette nouvelle fonction. L'utilisation de formes mutantes d'USF1 pour restaurer la stabilité de p53 dans des fonds invalidés pour *Usf1* nous porte à croire que la partie C-terminal d'USF1 (delta 196-310) (**Article 1**) pourrait être minimalement requise pour la stabilisation du suppresseur de tumeur (données non publiées). Néanmoins nous ne savons pas si des modifications post-traductionnelles de cette partie de la protéine USF1, potentiellement initiées par le stress, sont nécessaires à l'association d'USF1 avec p53. Cette hypothèse est envisageable en regard à de nombreux travaux reliant USF1 au contrôle du métabolisme et de la différenciation lipidogénique et érythroblastique [^{537,539,599-602}]. En effet, l'ensemble de ces études suggère USF1 comme une sorte de plateforme d'arrimage nécessaire à la fixation de nombreux régulateurs de la transcription, dont des facteurs de transcription et des enzymes de modification de la chromatine, en proximité de l'ADN. Dans cette fonction, il a été décrit que les modifications post-traductionnelles sur la partie C-terminale d'USF1, phosphorylation et acétylation, étaient importantes dans la promotion de l'interaction physique entre USF1 et les autres régulateurs de la transcription. Dans ces études, les actions de DNAPK et de PCAF sur USF1 sont particulièrement importantes pour amorcer la fonction d'attractant protéique d'USF1 [^{537,539}]. Il est intéressant de noter que la kinase DNAPK et l'acétyl transférase PCAF sont des éléments pouvant être mobilisés par le stress UV [^{170,179,212,603}]. Dans ce cadre, il serait intéressant de tester l'impact de l'inhibition de DNAPK et de PCAF sur la stabilisation de p53 médiée par USF1 en réponse à l'exposition UVB.

Concernant l'activité antiproliférative d'USF1, à notre connaissance, nous sommes les premiers à impliquer USF1 dans le contrôle du cycle en réponse directe au stress UV *in vivo* et *in vitro*. En effet, USF1 a été impliqué dans le contrôle du cycle dans des conditions basales ou en réponse à la stimulation par des facteurs hormonaux comme la TSH [^{527,551,553,554}]. Ces données suggéraient de plus l'activité transcriptionnelle intrinsèque d'USF1 comme majoritairement requise pour contrôler des gènes impliqués dans le cycle comme la *CCND1*, *CDK1*, *CDK4*, *HTERT*, *APC* ou *BRCA2* [^{528,555-559}]. En plus de ces données, nos études montrent qu'USF1 indépendamment de sa fonction transcriptionnelle peut être impliqué dans le contrôle du cycle par le biais de la stabilisation de la protéine p53 en réponse aux UV. Notre découverte précise potentiellement certaines ambiguïtés des travaux du groupe de Sawadogo montrant la perte de fonction antiproliférative des facteurs USF dans un fond invalidé pour p53 [⁵²⁷]. En effet notre étude renforce l'hypothèse selon laquelle USF1 agit sur le cycle par le biais de p53. De la même manière, elle précise les données d'Apperlo et d'autres montrant que l'activité transcriptionnelle intrinsèque d'USF1 n'explique pas complètement ses effets antiprolifératifs et que d'autres régulateurs sont nécessaires à promouvoir cette fonction d'USF1 [^{527,554,577}]. Si notre étude montre que cette nouvelle fonction d'USF1 est importante pour la réponse cellulaire au stress UV, elle ne précise pas encore si ce concept peut être élargi à d'autres types de stress génotoxiques. De manière intéressante, USF1 est une cible cellulaire souvent détournée par les virus et les bactéries pour favoriser leurs multiplications [^{358,359}]. Parallèlement, dans de nombreux cas l'envahissement de l'hôte par les virus ou les bactéries potentialisent la prolifération de la cellule hôte par

le biais de l'inhibition de la fonction de la protéine p53 [106,108,395]. Dans ce cadre, il serait important d'analyser si en réponse à ces stress biologiques la perte de fonction de p53 ne peut pas également être liée à la perte d'activité d'USF1.

3.1.2. Coopération des voies USF1 et p53 dans le contrôle de gènes nécessaires à la prévention de l'instabilité génomique à des doses élevées d'UVB

En dehors de sa fonction d'interactant protéique, nous avons mis en évidence qu'USF1 en réponse à un stress UV élevé coopère avec p53 pour la régulation de cibles transcriptionnelles impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN. En effet, nous avons observé que la régulation transcriptionnelle des gènes *CDKN1A*, *SFN* et *PCNA* était à la fois sensible à la perte d'USF1 et à l'inhibition de la kinase de stress p38 α (**Article 1 et 2 et résultats supplémentaires Figures 26**). L'analyse *in silico* des promoteurs de ces gènes et particulièrement *CDKN1A* (**Article 1 et Annexe n°5**), montre qu'ils présentent, en plus de plusieurs éléments de réponse à p53, des boîtes E qui peuvent être reconnues par des facteurs de transcription de type bHLH-LZ. Ces données sont en accords avec les études isolées montrant que les facteurs de transcription USF1 et p53 présentent des cibles communes comme *APC*, *BRCA2* ou *HTERT*, toutes impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et la prévention de l'instabilité génomique [557,559–562]. Ils suggèrent également que les voies USF1 et p53 peuvent fonctionner indépendamment mais sont cependant complémentaires. Dans ce sens, USF1 a été impliqué dans le contrôle différentiel de certaines cibles transcriptionnelles de p53. Ainsi, il a été montré que la régulation de *PUMA*, un gène pro-apoptique dépendant de p53, faisait intervenir une modulation de la conformation de l'ADN impliquant entre autre le facteur USF1 [564]. A cela, mais dans des conditions d'arrêt du cycle, nous avons ajouté qu'USF1 pouvait se fixer, probablement de façon concomitante à p53, sur le promoteur d'autres gènes cibles de p53. Dans ce sens, nous avons montré que le promoteur du gène *CDKN1A*, une cible importante de p53, pouvait être occupé et activé par plusieurs bHLH-LZ dont USF1. A ce niveau, USF1 potentialise l'expression de p21 par p53 à des doses élevées d'UVB (**Article 2**). De façon importante d'autres bHLH-LZ, comme MITF, peuvent se substituer à USF1 dans la co-activation du promoteur du gène *CDKN1A*. Nous avons ainsi précisé que selon la combinaison des facteurs b-HLHLZ, comportant particulièrement USF2, l'activité du promoteur du gène *CDKN1A* pouvait également être atténuée. Ces résultats s'inscrivent dans l'effet activateur ou inhibiteur que peuvent avoir respectivement les bHLH-LZ Miz1 et c-Myc sur le promoteur *CDKN1A* humain [590].

En dehors des cibles en aval de p53, nous avons également identifié que des cibles impliquées dans la stabilisation de p53 ou la potentialisation de son activité, comme les protéines SFN ou Sertad1 [595,596], pouvaient être transcriptionnellement dépendantes d'USF1. Ces données suggèrent qu'USF1 pourrait également être associé à la stabilisation de p53 indirectement par son activité transcriptionnelle intrinsèque. Dans cette hypothèse, le gène *SFN* (ou *14-3-3 sigma*) pourrait-être un candidat important faisant le lien entre USF1 et la stabilité de p53. En effet, la *SFN* est une cible transcriptionnelle de p53 mais également une chaperonne capable de contrecarrer sa dégradation médiée par MDM2 [211,493,575]. Dans cette boucle

amplifiant la stabilité et la fonction de p53, nous ne pouvons exclure qu'USF1, dans des conditions de stress UV autre que celle que nous avons décrites dans nos études *in vivo* et *in vitro*, ne puissent agir sur la stabilité de p53 par le biais de la régulation transcriptionnelle de *SFN*. Dans ce sens, nous avons suivi l'induction de la *SFN* et d'USF1 dans le modèle HaCaT présentant une protéine p53 non fonctionnelle (résultats non publiés). Nous avons observé une induction de l'expression de l'ARNm et de la protéine *SFN* de façon concomitante à la phosphorylation d'USF1 30min après une dose élevée d'UVB. Cependant, nous n'avons pas pu reproduire ce résultat dans le mélanocyte de par l'expression faible de la *SFN* dans ce modèle par rapport au kératinocyte [493,604,605]. Il serait ainsi intéressant d'évaluer d'une part, l'effet de la perte d'USF1 sur la régulation transcriptionnelle de la *SFN* et d'autre part, l'effet de cette régulation sur la stabilité de p53 dans les kératinocytes exposés à des doses élevées d'UVB au cours de différentes cinétiques post-irradiations.

3.2. Rôle potentiel de la perte d'USF1 dans l'instabilité génomique et la transformation cellulaires induites par les UV et les toxiques environnementaux

Collectivement, nos données ainsi que celles d'autres équipes suggèrent qu'USF1 comme p53 est un élément prépondérant de la réponse aux stress génotoxiques environnementaux dont les UV font partie. Au vue des liens étroits que nous décrivons entre USF1 et p53, la question majeure reste de savoir si la perte de fonction d'USF1, comme celle de p53 [50-52,111,606,607], peut être en cause dans les cancers cutanés et plus largement dans la pathologie cancéreuse.

En ce qui concerne le tissu cutané, actuellement aucune mutation du gène *USF1* n'a été relevée dans les études de séquençage haut débit des différentes classes de mélanome [48,84,608]. Dans le cas des carcinomes cutanés, une étude menée sur huit cas de SCC révèle l'existence d'une mutation vraisemblablement somatique d'*USF1* (C574G) concomitante à celle du gène *TP53* dans un seul des cas [609]. Plus largement, en interrogeant la base de donnée COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer), il apparaît que plusieurs mutations ponctuelles d'*USF1* sont retrouvées dans différents cancers et particulièrement celui de l'endomètre où elles représenteraient 2,9 % des mutations reportées [610,611]. Cependant par rapport aux mutations de *TP53* dans les cancers cutanés en particulier et à l'ensemble des cancers en général, les mutations du gène *USF1* représentent des événements probablement très rares et dont la fréquence exacte et les conséquences fonctionnelles restent à être déterminées.

D'un point de vue fonctionnel, les liens entre USF1 et la carcinogenèse réfèrent majoritairement à la perte d'expression des cibles transcriptionnelles d'USF1 comme *PTEN* dans le syndrome de Cowden [612]. Il a ainsi été décrit que des mutations dans les boîtes E présentes dans le promoteur de *PTEN* empêchent la fixation du facteur USF1 ce qui altère l'expression de *PTEN* en cause dans le syndrome de Cowden [612]. Cette maladie rare de transmission autosomique dominante, se manifeste par des lésions mucocutanées et prédispose à de nombreux cancers, dont des cancers du sein et des cancers gastro-intestinaux [528,553,612,613]. De façon moins claire, la

perte de fonction transcriptionnelle des protéines USF (USF1 et/ou USF2) a été associée au potentiel prolifératif de plusieurs lignées de carcinomes mammaires [553]. Dans ces lignées cellulaires, les auteurs ne fournissent aucune donnée claire sur le statut mutationnel des facteurs *USF*. Dans la continuité de ces travaux, le même groupe suggère la présence de mutations d'*USF1* dans les lignées Hela et Saos-2 qu'ils ne mettent malheureusement pas à disposition [551].

En l'absence de mutations récurrentes d'*USF1* dans les cancers cutanés ou plus largement dans la pathologie cancéreuse, nos résultats nous amène aujourd'hui à nous questionner sur la potentielle dérégulation de l'expression d'USF1 par des mécanismes épigénétiques liés au stress environnemental. En effet, il a été montré que l'activation constitutive du gène *HTERT*, un gène négativement régulé par USF1 dans les conditions normales, pouvait être directement liée à la perte ou à la diminution d'expression des facteurs USF1 et USF2 dans les biopsies de cancers « tête et cou » ou (VADS pour Voies Aero-Digestives Supérieures qui comprennent les lèvres) [558]. Or ces cancers, particulièrement des carcinomes, sont très fortement associés à l'exposition chronique aux carcinogènes environnementaux impliquant la fumée de tabac, la pollution et l'exposition UV qui sont tous connus pour promouvoir l'hyperméthylation de l'ADN [614,615]. Ainsi, en dehors de mutations décrites dans les cancers tête et cou, l'extinction de l'expression des facteurs USF en générale et d'USF1 en particulier, par des modifications épigénétiques, ne serait-elle pas impliquée dans l'initiation de la carcinogenèse ? Un tel scénario peut être envisagé dans le cadre d'autres stress oncogéniques comme l'infection par la bactérie *Helicobacter pylori* (HP). Dans ce cas il a été montré que l'infection par HP entraîne la méthylation du promoteur du gène *USF1* et l'inhibition subséquente de l'expression de la protéine dans les cellules épithéliales gastriques [616]. De manière intéressante, l'infection par HP a également été associée à l'inhibition de la stabilisation de la protéine p53 et à l'expression de formes dominantes négatives du suppresseur de tumeur [422-424]. Mécanistiquement, l'infection par HP est connue pour induire une inflammation excessive chronique à l'origine de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote qui favorisent l'instabilité génomique et la transformation des cellules de l'épithélium gastrique [617-619]. A la vue de nos résultats, est-ce que la méthylation du promoteur du gène *USF1* et son extinction comme dans le cas de l'infection par HP ne serait pas un élément important dans la perte de la stabilité de p53 et la transformation cellulaire ? Si cette question s'avère positive, ne doit-on pas envisager la perte d'USF1 par méthylation comme un mécanisme plus générale à l'origine de la transformation cellulaire induite par les carcinogènes environnementaux ?

3.3. Directions Futures

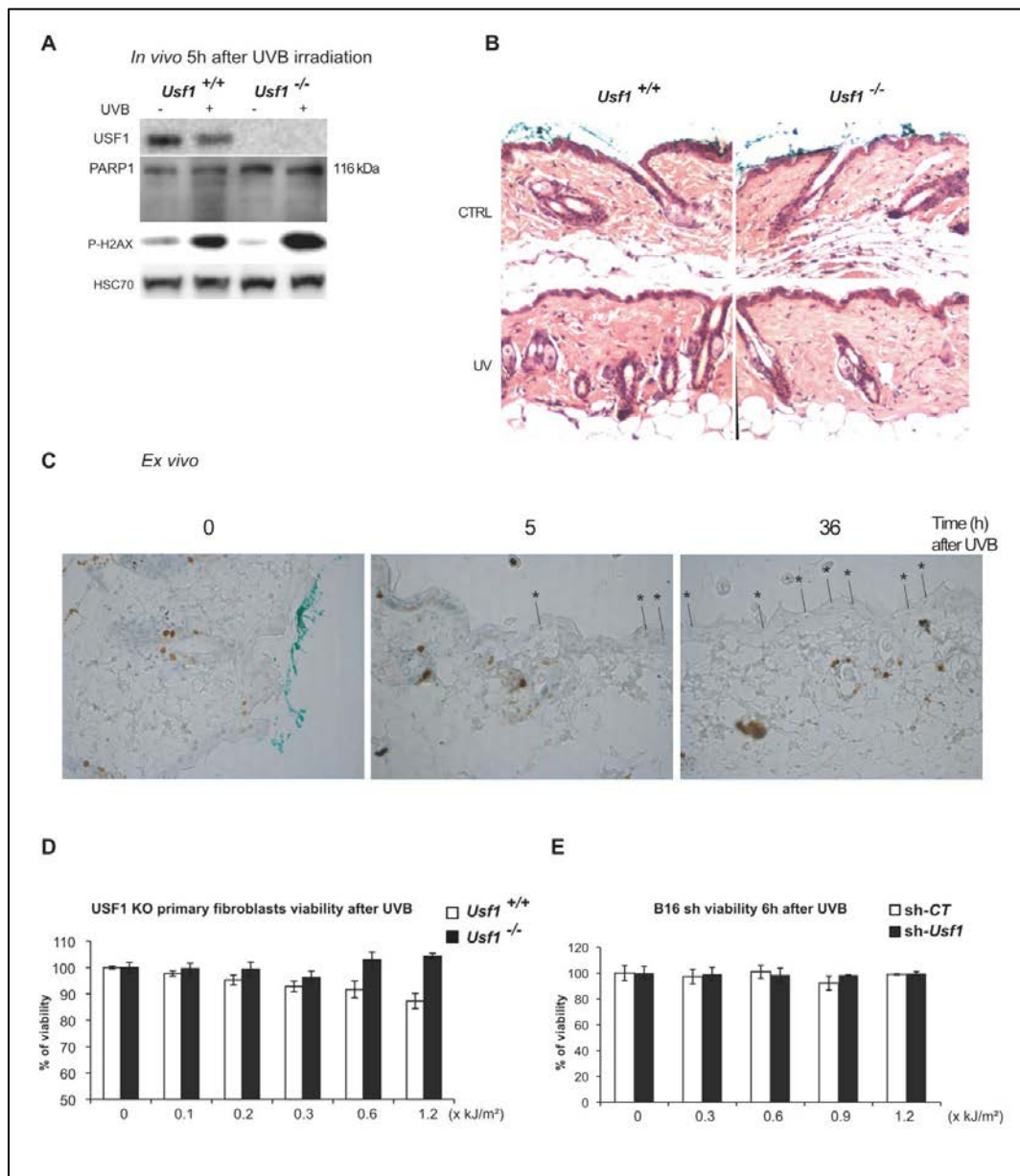
Au total, nos travaux sur le facteur USF1 ont établi une réponse quant à son lien avec le suppresseur de tumeur p53 en réponse aux stress UV. Néanmoins, ils ont également soulevé plusieurs questions d'ordre mécanistique mais également fonctionnel.

Parmi les questions d'ordre mécanistique, l'identification des activateurs de l'association physique USF1-p53 en réponse à l'exposition UV ainsi que les

domaines d'interactions entre les deux protéines restent importantes. Ces informations sont notamment importantes aux vues des stratégies de réactivation du suppresseur de tumeur dans les cancers en général et dans le mélanome en particulier [^{566–570,572,573}]. Dans ce sens, comment les deux facteurs de transcription collaborent pour assurer un programme transcriptionnel adapté aux types et à l'intensité du stress UV ? Sur le plan fonctionnel, la question majeure reste la mise en évidence du lien direct entre perte d'expression des facteurs USF en générale et d'USF1 en particulier dans les cancers associés aux stress environnementaux.

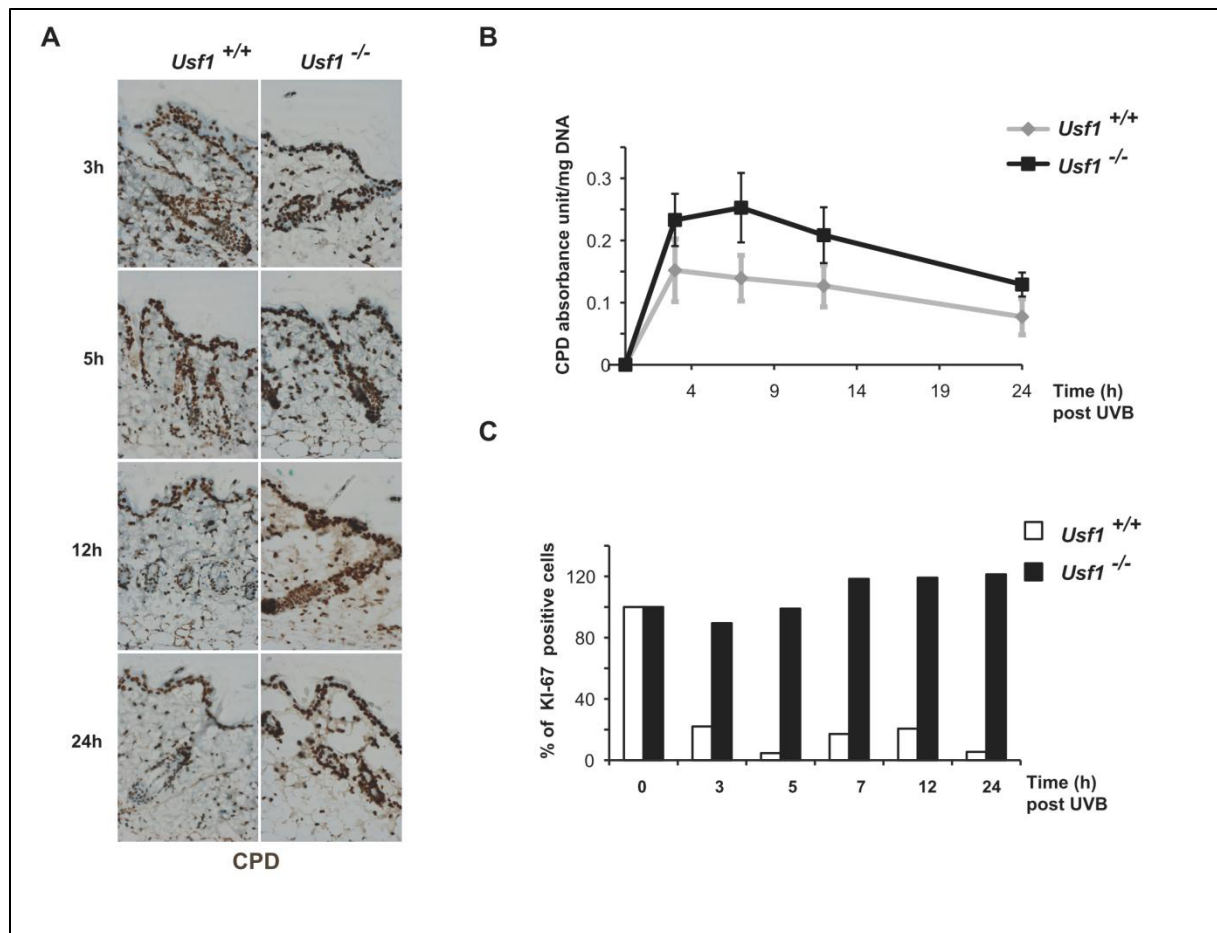
Chapitre 5 Annexes, congrès et bibliographie

1. Annexes



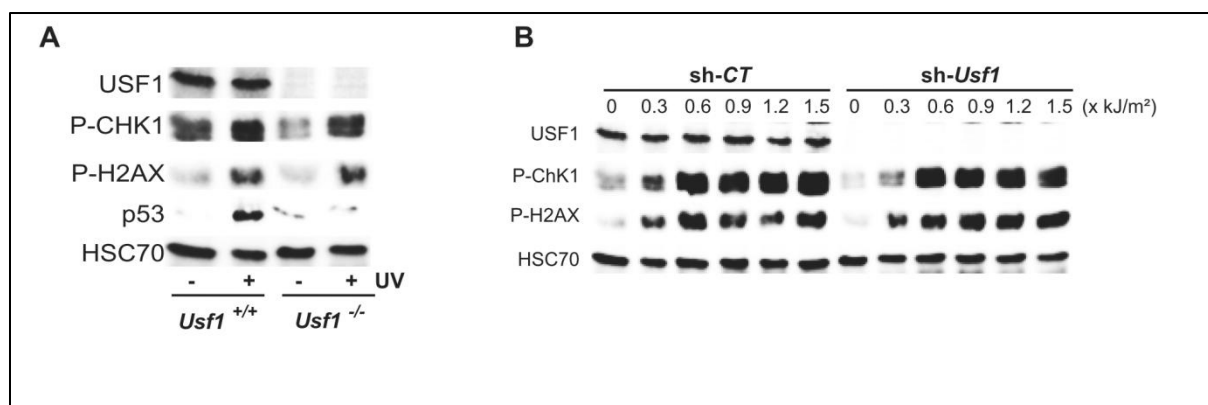
Annexe 1 : Résultats complémentaires Article 1.

***In vivo* et *in vitro* les doses d'UVB utilisées n'induisent pas d'apoptose dans les 12 à 24 h post-irradiation.** A. Suivi du clivage de PARP1 dans les échantillons protéiques *in vivo* 5h post-UVB. B. Epaisseurs des épidermes des souris invalidées ou non pour *Usf1* avant et après l'irradiation. C. Contrôle d'apparition significative des sunburn cells au-delà de 24h post-irradiation dans les cultures organotypiques issues de souris sauvages irradiées ou non par 5kJ/m² d'UVB. D. Viabilité des fibroblastes primaires isolés à partir des souris des deux génotypes après exposition à des doses croissantes d'UVB 6 h post-irradiation. E. Même expérience qu'en D mais sur les cellules B16 déficientes ou non en protéine USF1. Pour information sur le matériel et les méthodes se référer à l'Article 1.



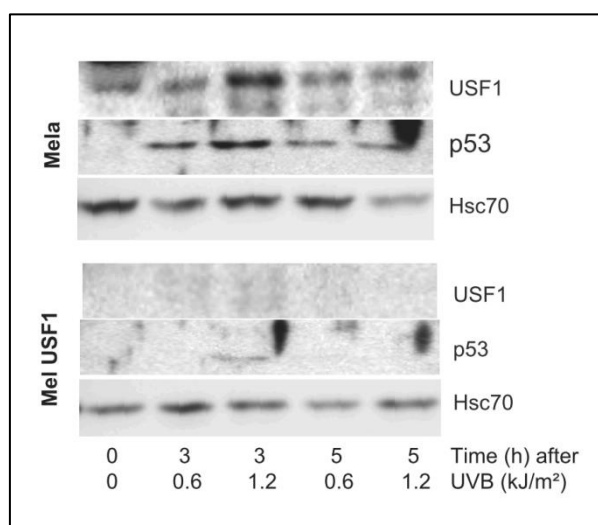
Annexe 2 : Résultats complémentaires Article 1.

L'arrêt de la prolifération induit par l'exposition UVB n'est pas retardé dans les souris invalidées pour *Usf1* par rapport aux souris sauvages. A. Coupes histologiques marquant les lésions à l'ADN de type CPD réalisées à partir des explants de souris sauvages (*Usf1*^{+/+}) ou invalidées pour *Usf1* (*Usf1*^{-/-}) après exposition à 5kj/m2 UVB. B. Dosage par ELISA des CPD dans les souris des deux types de génotypes après exposition UVB. C. Analyse quantitative du nombre de cellules proliférantes (Ki positives) dans les souris des deux génotypes après exposition UVB.



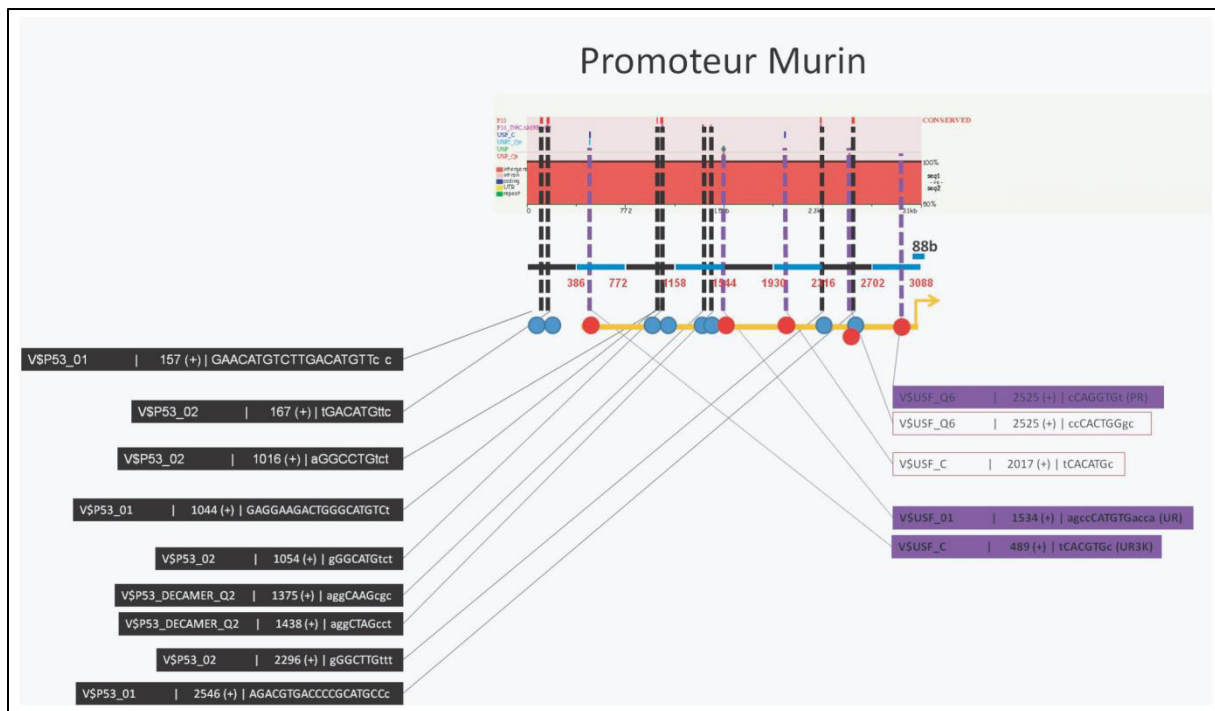
Annexe 3 : Résultats complémentaires Article 1.

La déficience en protéine USF1 n'affecte pas la reconnaissance et la transduction des signaux de dommages à l'ADN. A. Western blot montrant dans les cellules B16 sh *Usf1* l'activation des kinases effectrices des voies de reconnaissance et de transduction des signaux de dommages à l'ADN. B. Etude de l'activation des signaux de transduction des dommages à l'ADN en fonction de doses croissantes d'UVB. Pour le matériel et les méthodes se référer à l'Article 1.



Annexe 4 : Résultats complémentaires Article 1.

La perte d'USF1 dans des lignées de mélanomes autres que B16 affecte également la stabilisation de p53 en réponse à l'exposition UVB. Analyses par Western blot de l'effet du KO d'USF1 sur la réponse p53 dans les lignées de mélanome murin Mel. Pour le matériel et les méthodes se référer à l'Article 1.



Annexe 5 : Promoteur du gène murin *CDKN1A*.

Schéma du promoteur réalisé à partir de l'analyse *in silico* d'une séquence d'environ 3kb en aval du codon start du gène *CDKN1A* murin. Les sites potentiels de fixation des différentes protéines ainsi que leurs séquences consensus ont été identifiées par le programme ZPicture [620].

Role of upstream stimulating factor 1 (USF-1) in skin response to UVB

Bouafia A., Corre S., Mouchet N., Galibert MD., RTO team, IGDR, CNRS-UMR6061 University Rennes1

amine.bouafia@univ-rennes1.fr

Abstract

p38α-USF-1 pathway have been proposed as a crucial regulator of environmental stress response allowing cell to modulate expression of key cytoprotective genes. However these observations realized *in vitro* have not documented the role of USF-1 in skin submitted to carcinogenic compounds, particularly to UVB.

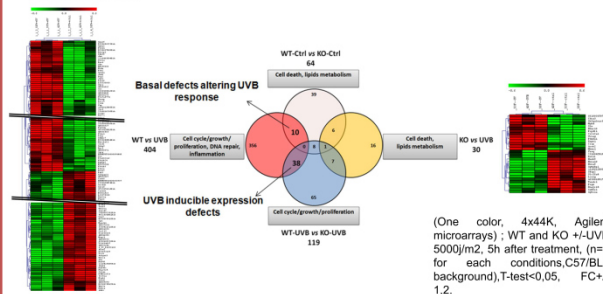
To described the role of USF-1 in the skin UVB response, we have analyzed the *in vivo* transcriptome of USF-1 KO vs wild type skin mice after UVB irradiation. We further validate p38α and USF-1 potentials targets genes by an *ex-vivo* approach and define USF-1 KO mice skin phenotype after irradiation by histological analysis.

Transcriptomic analysis demonstrates that USF-KO impaired correct expression of cell cycle and DNA repair genes following UVB irradiation. *Ex vivo*, we proved that both USF-1 KO and p38 α inhibitor alone or synergistically counteract *Sfn*, *Cdkn1a*, *Sertad1* and *Ube2s* cell cycle regulators and *Pcna*, *Ercc8* DNA repair genes up-regulation in response to UVB. Preliminary histological analysis highlighted a USF-1 KO phenotype characterized by defects in skin cell proliferation arrest after unique UVB irradiation and skin regeneration after a protocol of repetitive irradiation. Our results suggest that USF-1 may be a key factor in skin protection against UVB, modulating cell cycle and DNA repair genes. USF-1 deregulation could thus lead to genomic instability in response to UVB irradiation.

Results

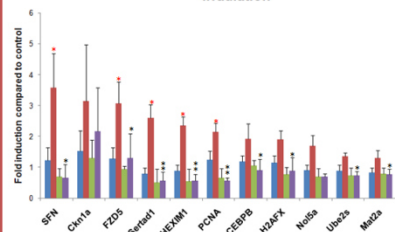
A. *In vivo*, USF-1 KO mice skin exhibit an altered UVB response

- 1. Transcriptomic analysis of differentially expressed genes following 5000j/m² UVB irradiation shows impairment of important UVB responsive genes networks in USF-1 KO mice



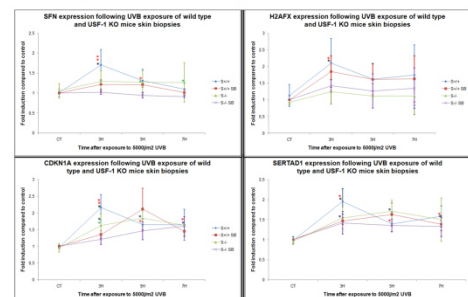
- 2. qPCR validation of UVB inducible genes expression in WT and USF-1 KO mice

In vivo mice skin response following 2 DEM UVB irradiation

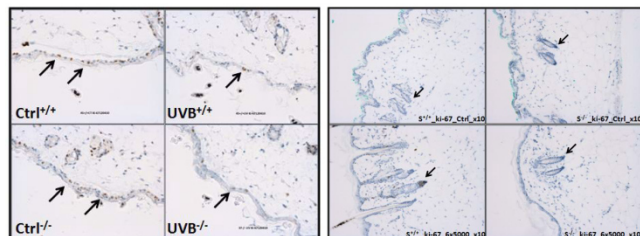


B. UVB inducible genes expression is altered in USF-1 KO or after inhibition of p38α in skin organotypic culture

- *Sfn*, *H2afx*, *Cdkn1a* and *Sertad1* kinetic expression after UVB irradiation of WT and USF-1 KO skin explants +/- SB203580 compound



C. USF-1 KO impairs early skin cells proliferation arrest after unique UVB irradiation and alters skin cell regeneration after repetitive irradiation



- 1. Ki-67 staining after a unique 5000j/m² UVB irradiation and skins recovered 5h later.
- 2. Ki-67 staining after repetitive 5000j/m² UVB irradiation (x6, 15 days) and skins recovered 48h later.

Conclusions and prospects

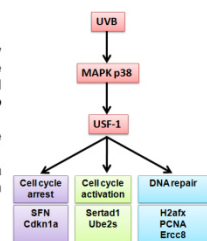
The present study illustrates USF-1 as a master regulator of the responsive genes network modulated after skin UVB irradiation.

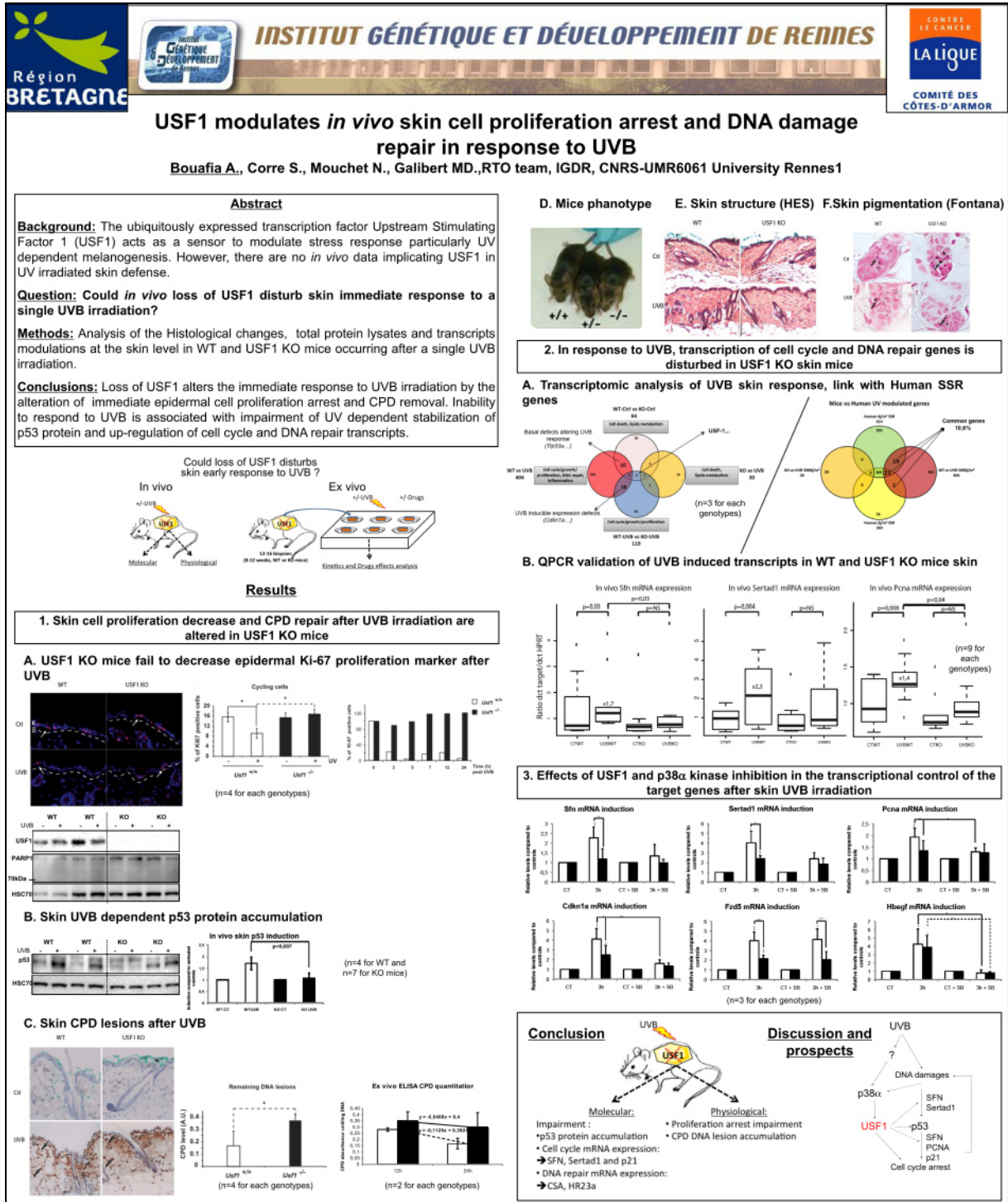
It participates in the control of cell cycle and DNA repair genes networks as suggested by the *in vivo* effect of the USF-1KO. Effectively these mice exhibit a significantly (T<0.05) less important number of genes (90% less) modulated in response to UVB compared to wild type mice (fig. A.1). Based on a previous work describing the role of p38MAPK in the human skin response to SSR (N. Mouchet *et al.*, 2010), we find that 11% of the related genes were common with the list of wild type mice UVB inducible genes. Focusing on these genes we validate *in vivo* their modulation in wild type mice and their impairment in USF-1 KO mice (fig. A.2).

On the base that p38α is a stress responsive kinase that drives USF-1 activity, we confirm the involvement of these two partners in the control of cell cycle genes expression ; *Sfn*, *Cdkn1a*, *Sertad1*, *Ube2s* (fig. B) and DNA repair genes; *H2afx* (fig. B), *Pcna*, and *Ercc8*.

Preliminary histological studies drive us to think that phenotypically USF-1 KO mice skin response to UVB could be characterized by; a defect in cell cycle arrest to allow DNA repair after unique UVB irradiation (fig. C.1) and a defect in skin hyperplasia important to protect from UVB and to allow skin regeneration after repetitive irradiations (fig. C.2).

Further analysis remain to be done to complete the UVB responsive genes drove by USF-1 but the present data suggest a major role of USF-1 in the UV genomic instability prevention.





Annexe 7 : Poster n°2

2. Congrès, Présentations

- **2009-2010**

14/06/2010 : Journée des Doctorants et Post-Doctorant en Biologie et Santé en Bretagne, présentation de poster (**Annexe 6**)

01/12/2009 : « 1^{er} Colloque Europa », séminaire d'un jour sur les innovations en microscopie et imagerie au campus de Beaulieu à Rennes (35), présentation d'un poster (Annexe 6).

16/06/10 : « 7th Melanoma meeting, Emerging concept in melanoma biology, Pave the road to new therapies », congrès de trois jours organisé par l'ESPCR à Nice (06).

16/12/2010 : « 2^{ème} colloque Risc-UV », organisé par Emmanuelle Mahé à l'Université Paris 6-Jussieu (75) pendant une journée.

- **2011-2012 :**

28/05/2011 : « Cell cycle cancer and Developement », congrès organisé par la SBCF à St Malo (35) pendant quatre jours, présentation d'un poster (**Annexe 6**)

21/09/2011 : « 8th International Pigment Cell Congress », congrès de 4 jours organisé par l'IPCC à Bordeaux (33), présentation d'un poster (**Annexe 7**).

01/12/2012 : « 1^{er} Colloque Europa », séminaire d'un jour sur les innovations en microscopie et imagerie au campus de Beaulieu à Rennes (35), présentation d'un poster (**Annexe 7**).

3. Bibliographie

1. McGrath, J. A., Eady, R. A. J. & Pope, F. M. Rook's Textbook of Dermatology, Seventh Edition - Wiley Online Library. *Rook's Textb. Dermatology, Seventh Ed.* 45–128 (2008).
2. Lai-Cheong, J. E. & McGrath, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (Baltimore)*. **37**, 223–226 (2009).
3. Kanitakis, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* **12**, 390–9 (2002).
4. Aubin, F. et al., Serge BOULINGUEZ, Stéphane DALLE, Alain DUPUY, Laurent MEUNIER, Dominique PENSO-ASSATHIANY, Antoine PETIT, François PRIGENT, J. R. Comprendre. *Ann. Dermatologie Vénéréologie - Présentation - EM|consulte* 132:8S3–8S5, 98 (2005).
5. Cinnamon VanPutte, Jennifer Regan, Andrew Russo, Philip Tate, Trent Stephens, R. S. Chapter 5 - Seeley's Anatomy & Physiology 10th Edition Alternative. *Chapter 5 - Seeley's Anat. Physiol. 10th Ed. Altern.* 1–23 (2004).
6. Wickett, R. R. & Visscher, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. *Am. J. Infect. Control* **34**, S98–S110 (2006).
7. Proksch, E., Brandner, J. M. & Jensen, J.-M. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* **17**, 1063–72 (2008).
8. Fuchs, E. Skin stem cells: rising to the surface. *J. Cell Biol.* **180**, 273–84 (2008).
9. Zouboulis, C. C., Adjaye, J., Akamatsu, H., Moe-Behrens, G. & Niemann, C. Human skin stem cells and the ageing process. *Exp. Gerontol.* **43**, 986–97 (2008).
10. Nemes, Z. & Steinert, P. M. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.* **31**, 5–19 (1999).
11. Nishimura, E. K. et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* **416**, 854–60 (2002).
12. Masatake Osawa. in *StemBook* (Watt, F. G. and F.) 23 (2009).
13. Scott, G. A. in *Pigment. Syst.* 171–180 (Blackwell Publishing Ltd, 2007). doi:10.1002/9780470987100.ch8
14. Boissy, R. E., Huizing, M. & Gahl, W. A. in *Pigment. Syst.* 155–170 (Blackwell Publishing Ltd, 2007). doi:10.1002/9780470987100.ch7
15. Byers, H. R. in *Pigment. Syst.* 181–190 (Blackwell Publishing Ltd, 2007). doi:10.1002/9780470987100.ch9

16. Holikova, Z., Hercogova, J., Plzak, J. & Smetana, K. Dendritic cells and their role in skin-induced immune responses. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **15**, 116–120 (2001).
17. Toebak, M. J., Gibbs, S., Bruynzeel, D. P., Scheper, R. J. & Rustemeyer, T. Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermatitis* **60**, 2–20 (2009).
18. Bernstein, E. F. & Uitto, J. The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. *Clin. Dermatol.* **14**, 143–51 (1996).
19. Diffey, B. L. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* **28**, 4–13 (2002).
20. Svobodova, A., Walterova, D. & Vostalova, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* **150**, 25–38 (2006).
21. Godar, D. E. UV doses worldwide. *Photochem. Photobiol.* **81**, 736–49
22. Gandini, S. *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur. J. Cancer* **41**, 45–60 (2005).
23. Kennedy, C., Bajdik, C. D., Willemze, R., De Gruijl, F. R. & Bouwes Bavinck, J. N. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 1087–93 (2003).
24. Lee, C.-H., Wu, S.-B., Hong, C.-H., Yu, H.-S. & Wei, Y.-H. Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6414–35 (2013).
25. Maverakis, E. *et al.* Light, including ultraviolet. *J. Autoimmun.* **34**, J247–57 (2010).
26. Sage, R. J. & Lim, H. W. UV-based therapy and vitamin D. *Dermatol. Ther.* **23**, 72–81
27. Walker, D. & Jacobe, H. Phototherapy in the age of biologics. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **30**, 190–8 (2011).
28. Pattison, D. I. & Davies, M. J. Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS* 131–57 (2006).
29. Young, A. R. *et al.* The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 982–8 (1998).
30. Rittié, L. & Fisher, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **1**, 705–20 (2002).

31. Ridley, A. J., Whiteside, J. R., McMillan, T. J. & Allinson, S. L. Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* **85**, 177–95 (2009).
32. Wondrak, G. T., Jacobson, M. K. & Jacobson, E. L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem. Photobiol. Sci.* **5**, 215–37 (2006).
33. Bickers, D. R. & Athar, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 2565–75 (2006).
34. Douki, T. *et al.* Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role. *Photochem. Photobiol.* **70**, 184–90 (1999).
35. Douki, T., Reynaud-Angelin, A., Cadet, J. & Sage, E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry* **42**, 9221–6 (2003).
36. Ravanat, J. L., Douki, T. & Cadet, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B.* **63**, 88–102 (2001).
37. Greinert, R. *et al.* UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10263–73 (2012).
38. Lipscomb, L. A. *et al.* X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 719–23 (1995).
39. Brégeon, D., Peignon, P.-A. & Sarasin, A. Transcriptional mutagenesis induced by 8-oxoguanine in mammalian cells. *PLoS Genet.* **5**, e1000577 (2009).
40. Shibutani, S., Takeshita, M. & Grollman, A. P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* **349**, 431–4 (1991).
41. Drobetsky, E. A., Turcotte, J. & Châteauneuf, A. A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2350–4 (1995).
42. Huang, X. X., Bernerd, F. & Halliday, G. M. Ultraviolet A within sunlight induces mutations in the epidermal basal layer of engineered human skin. *Am. J. Pathol.* **174**, 1534–43 (2009).
43. Mouret, S. *et al.* Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13765–70 (2006).
44. Perdiz, D. *et al.* Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 26732–42 (2000).

45. Pfeifer, G. P., You, Y.-H. & Besaratinia, A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat. Res.* **571**, 19–31 (2005).
46. You, Y. H. *et al.* Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 44688–94 (2001).
47. Ikehata, H. & Ono, T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J. Radiat. Res.* **52**, 115–25 (2011).
48. Hodis, E. *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251–63 (2012).
49. Kim, J. K., Patel, D. & Choi, B. S. Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem. Photobiol.* **62**, 44–50 (1995).
50. Sarasin, A. The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutat. Res.* **428**, 5–10 (1999).
51. Giglia-Mari, G. & Sarasin, A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum. Mutat.* **21**, 217–28 (2003).
52. Daya-Grosjean, L. & Sarasin, A. The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutat. Res.* **571**, 43–56 (2005).
53. Kunisada, M. *et al.* 8-Oxoguanine formation induced by chronic UVB exposure makes Ogg1 knockout mice susceptible to skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **65**, 6006–10 (2005).
54. John A. D'Orazio, S. J. A. M. J. L. and L. C. *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma*. (InTech, 2013). doi:10.5772/46052
55. Armstrong, B. K. & Krickler, a. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B.* **63**, 8–18 (2001).
56. OMS, Cancers cutanés. (2013). at <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/fr/index1.html>> (Site consulté la dernière fois le 12/02/14)
57. *La situation du cancer en France en 2012. état des lieux des connaissances* (INCa, 2012).
58. Narayanan, D. L., Saladi, R. N. & Fox, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int. J. Dermatol.* **49**, 978–86 (2010).

59. Gilchrest, B. A., Eller, M. S., Geller, A. C. & Yaar, M. The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation — NEJM. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1341–8 (1999).
60. Xie, J. *et al.* Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* **391**, 90–2 (1998).
61. Wang, Y. *et al.* Evidence of ultraviolet type mutations in xeroderma pigmentosum melanomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 6279–84 (2009).
62. Pierceall, W. E., Kripke, M. L. & Ananthaswamy, H. N. N-ras mutation in ultraviolet radiation-induced murine skin cancers. *Cancer Res.* **52**, 3946–51 (1992).
63. Kress, S. *et al.* Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Res.* **52**, 6400–3 (1992).
64. Klein-Szanto, A. J., Silvers, W. K. & Mintz, B. Ultraviolet radiation-induced malignant skin melanoma in melanoma-susceptible transgenic mice. *Cancer Res.* **54**, 4569–72 (1994).
65. Chan, J. *et al.* Characterization of the CDKN2A and ARF genes in UV-induced melanocytic hyperplasias and melanomas of an opossum (*Monodelphis domestica*). *Mol. Carcinog.* **31**, 16–26 (2001).
66. Kannan, K. *et al.* Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1221–5 (2003).
67. Starcher, B., O'Neal, P., Granstein, R. D. & Beissert, S. Inhibition of Neutrophil Elastase Suppresses the Development of Skin Tumors in Hairless Mice. *J. Invest. Dermatol.* **107**, 159–163 (1996).
68. Abel, E. L., Angel, J. M., Kiguchi, K. & DiGiovanni, J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat. Protoc.* **4**, 1350–62 (2009).
69. Hussein, M. R., Al-Badaiwy, Z. H. & Guirguis, M. N. Analysis of p53 and bcl-2 protein expression in the non-tumorigenic, pretumorigenic, and tumorigenic keratinocytic hyperproliferative lesions. *J. Cutan. Pathol.* **31**, 643–51 (2004).
70. Hussein, M. R., Haemel, a K. & Wood, G. S. P53-Related Pathways and the Molecular Pathogenesis of Melanoma. *Eur. J. Cancer Prev.* **12**, 93–100 (2003).
71. Roshan, A. & Jones, P. H. Chronic low dose UV exposure and p53 mutation: tilting the odds in early epidermal preneoplasia? *Int. J. Radiat. Biol.* **88**, 682–7 (2012).

72. Dumaz, N., Drougard, C., Sarasin, a & Daya-Grosjean, L. Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10529–33 (1993).
73. Daya-Grosjean, L. & Sarasin, a. UV-specific mutations of the human patched gene in basal cell carcinomas from normal individuals and xeroderma pigmentosum patients. *Mutat. Res.* **450**, 193–9 (2000).
74. Daya-Grosjean, L. & Couvé-Privat, S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett.* **225**, 181–92 (2005).
75. Suarez, H. G. *et al.* Activated oncogenes in human skin tumors from a repair-deficient syndrome, xeroderma pigmentosum. *Cancer Res.* **49**, 1223–8 (1989).
76. Mayer, C. & Grummt, I. Cellular stress and nucleolar function. *Cell Cycle* **4**, 1036–8 (2005).
77. Keijzer, W. *et al.* Establishment and characterization of a melanoma cell line from a xeroderma pigmentosum patient: activation of N-ras at a potential pyrimidine dimer site. *Cancer Res.* **49**, 1229–35 (1989).
78. D'Errico, M. *et al.* UV mutation signature in tumor suppressor genes involved in skin carcinogenesis in xeroderma pigmentosum patients. *Oncogene* **19**, 463–7 (2000).
79. Couvé-Privat, S., Bouadjar, B., Avril, M. F., Sarasin, A. & Daya-Grosjean, L. Significantly high levels of ultraviolet-specific mutations in the smoothened gene in basal cell carcinomas from DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res.* **62**, 7186–9 (2002).
80. Couvé-Privat, S. *et al.* Functional analysis of novel sonic hedgehog gene mutations identified in basal cell carcinomas from xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res.* **64**, 3559–65 (2004).
81. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–54 (2002).
82. Pleasance, E. D. *et al.* A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* **463**, 191–6 (2010).
83. Maddodi, N. & Setaluri, V. Role of UV in cutaneous melanoma. *Photochem. Photobiol.* **84**, 528–36 (2008).
84. Mar, V. J. *et al.* BRAF/NRAS wild-type melanomas have a high mutation load correlating with histologic and molecular signatures of UV damage. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4589–98 (2013).

85. Zaidi, M. R., Day, C.-P. & Merlino, G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2381–91 (2008).
86. Preston, D. S. & Stern, R. S. Nonmelanoma cancers of the skin. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1649–62 (1992).
87. Aszterbaum, M. *et al.* Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nat. Med.* **5**, 1285–91 (1999).
88. Tsatsou, F., Trakatelli, M., Patsatsi, A., Kalokasidis, K. & Sotiriadis, D. Extrinsic aging: UV-mediated skin carcinogenesis. *Dermatoendocrinol.* **4**, 285–97 (2012).
89. Zhang, H. *et al.* Role of PTCH and p53 genes in early-onset basal cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **158**, 381–5 (2001).
90. Rass, K. & Reichrath, J. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **624**, 162–78 (2008).
91. Kuchelmeister, C., Schaumburg-Lever, G. & Garbe, C. Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br. J. Dermatol.* **143**, 275–80 (2000).
92. Agar, N. & Young, A. R. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutat. Res.* **571**, 121–32 (2005).
93. Bang, K. M., Halder, R. M., White, J. E., Sampson, C. C. & Wilson, J. Skin cancer in black Americans: a review of 126 cases. *J. Natl. Med. Assoc.* **79**, 51–8 (1987).
94. Fitzpatrick, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch. Dermatol.* **124**, 869–71 (1988).
95. Greinert, R. Skin cancer: new markers for better prevention. *Pathobiology* **76**, 64–81 (2009).
96. Harrison, S. L., MacLennan, R. & Buettner, P. G. Sun exposure and the incidence of melanocytic nevi in young Australian children. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17**, 2318–24 (2008).
97. Hussein, M. R. A.-E. & Wood, G. S. Molecular aspects of melanocytic dysplastic nevi. *J. Mol. Diagn.* **4**, 71–80 (2002).
98. Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. & Marais, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445**, 851–7 (2007).
99. Hocker, T. & Tsao, H. Ultraviolet Radiation and Melanoma: A Systematic Review and Analysis of Reported Sequence Variants. **28**, 578–588 (2007).

100. Tsao, H., Goel, V., Wu, H., Yang, G. & Haluska, F. G. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 337–41 (2004).
101. Willmore-Payne, C., Holden, J. a, Tripp, S. & Layfield, L. J. Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum. Pathol.* **36**, 486–93 (2005).
102. Edwards, R. H. *et al.* Absence of BRAF mutations in UV-protected mucosal melanomas. *J. Med. Genet.* **41**, 270–272 (2004).
103. Curtin, J. a *et al.* Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2135–47 (2005).
104. Gast, A. *et al.* Somatic Alterations in the Melanoma Genome: A High-Resolution Array-Based Comparative Genomic Hybridization Study. **745**, 733–745 (2010).
105. Pollock, P. M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* **33**, 19–20 (2003).
106. Lane, D. & Levine, A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000893 (2010).
107. Latonen, L. & Laiho, M. Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. *Biochim. Biophys. Acta* **1755**, 71–89 (2005).
108. May, P. & May, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**, 7621–36 (1999).
109. Miller, a J. & Tsao, H. New insights into pigmentary pathways and skin cancer. *Br. J. Dermatol.* **162**, 22–8 (2010).
110. Soufir, N. *et al.* P16 UV mutations in human skin epithelial tumors. *Oncogene* **18**, 5477–81 (1999).
111. Benjamin, C. L. & Ananthaswamy, H. N. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **224**, 241–8 (2007).
112. Rebel, H. *et al.* Early p53-positive foci as indicators of tumor risk in ultraviolet-exposed hairless mice: kinetics of induction, effects of DNA repair deficiency, and p53 heterozygosity. *Cancer Res.* **61**, 977–83 (2001).
113. Ziegler, a *et al.* Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 4216–20 (1993).
114. Brash, D. E. *et al.* A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10124–8 (1991).

115. Zhang, W., Remenyik, E., Zelterman, D., Brash, D. E. & Wikonkal, N. M. Escaping the stem cell compartment: sustained UVB exposure allows p53-mutant keratinocytes to colonize adjacent epidermal proliferating units without incurring additional mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13948–53 (2001).
116. Jonason, a S. *et al.* Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14025–9 (1996).
117. Soufir, N. *et al.* Association between INK4a-ARF and p53 mutations in skin carcinomas of xeroderma pigmentosum patients. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1841–7 (2000).
118. Hodges, A. & Smoller, B. R. Immunohistochemical comparison of p16 expression in actinic keratoses and squamous cell carcinomas of the skin. *Mod. Pathol.* **15**, 1121–5 (2002).
119. Nakamura, S. & Nishioka, K. Enhanced expression of p16 in seborrhoeic keratosis; a lesion of accumulated senescent epidermal cells in G1 arrest. *Br. J. Dermatol.* **149**, 560–5 (2003).
120. Saridaki, Z. *et al.* Mutational analysis of CDKN2A genes in patients with squamous cell carcinoma of the skin. *Br. J. Dermatol.* **148**, 638–48 (2003).
121. Harrison, S. L., Buettner, P. G. & MacLennan, R. Body-site distribution of melanocytic nevi in young Australian children. *Arch. Dermatol.* **135**, 47–52 (1999).
122. Ping, X. L. *et al.* PTCH mutations in squamous cell carcinoma of the skin. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 614–6 (2001).
123. Popp, S., Waltering, S., Herbst, C., Moll, I. & Boukamp, P. UV-B-type mutations and chromosomal imbalances indicate common pathways for the development of Merkel and skin squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer* **99**, 352–60 (2002).
124. Sauroja, I. *et al.* Analysis of G(1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes. Chromosomes Cancer* **28**, 404–14 (2000).
125. Ferguson, B. *et al.* Differential roles of the pRb and Arf/p53 pathways in murine naevus and melanoma genesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 771–80 (2010).
126. Peris, K. *et al.* UV fingerprint CDKN2a but no p14ARF mutations in sporadic melanomas. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 825–6 (1999).
127. Van 't Veer, L. J. *et al.* N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 3114–6 (1989).

128. Eskandarpour, M. *et al.* Frequency of UV-Inducible NRAS Mutations in Melanomas of Patients With Germline CDKN2A Mutations. **95**, (2003).
129. Terzian, T. *et al.* P53 Prevents Progression of Nevi To Melanoma Predominantly Through Cell Cycle Regulation. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 781–94 (2010).
130. Lee, J. Y. *et al.* Genetic Alterations of p16 INK4a and p53 Genes in Sporadic Dysplastic Nevus 1. **672**, 667–672 (1997).
131. Monahan, K. B. *et al.* Somatic p16(INK4a) loss accelerates melanomagenesis. *Oncogene* **29**, 5809–17 (2010).
132. Ferguson, D. O. & Alt, F. W. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene* **20**, 5572–9 (2001).
133. Polsky, D. *et al.* HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. *Cancer Res.* **61**, 7642–6 (2001).
134. Talve, L., Sauroja, I., Collan, Y., Punnonen, K. & Ekfors, T. Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int. J. Cancer* **74**, 255–9 (1997).
135. Kamijo, T. *et al.* Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**, 649–59 (1997).
136. Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704–7 (1993).
137. Yogev, O., Saadon, K., Anzi, S., Inoue, K. & Shaulian, E. DNA damage-dependent translocation of B23 and p19 ARF is regulated by the Jun N-terminal kinase pathway. *Cancer Res.* **68**, 1398–406 (2008).
138. Honda, R. & Yasuda, H. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J.* **18**, 22–7 (1999).
139. Sarkar-Agrawal, P., Vergilis, I., Sharpless, N. E., DePinho, R. a & Rünger, T. M. Impaired processing of DNA photoproducts and ultraviolet hypermutability with loss of p16INK4a or p19ARF. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 1790–3 (2004).
140. Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348**, 730–2
141. Sakurai, T. *et al.* Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348**, 732–5
142. Pacifico, a *et al.* Loss of CDKN2A and p14ARF expression occurs frequently in human nonmelanoma skin cancers. *Br. J. Dermatol.* **158**, 291–7 (2008).

143. Satyamoorthy, K. *et al.* Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res.* **63**, 756–9 (2003).
144. Van der Schroeff, J. G., Evers, L. M., Boot, A. J. & Bos, J. L. Ras oncogene mutations in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin. *J. Invest. Dermatol.* **94**, 423–5 (1990).
145. Cohen, C. *et al.* Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin. Cancer Res.* **8**, 3728–33 (2002).
146. Broome Powell, M. *et al.* Induction of melanoma in TPras transgenic mice. *Carcinogenesis* **20**, 1747–53 (1999).
147. Wu, H., Goel, V. & Haluska, F. G. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* **22**, 3113–22 (2003).
148. Gruber, F. *et al.* Molecular and genetic mechanisms in melanoma. *Coll. Antropol.* **32 Suppl 2**, 147–52 (2008).
149. Stahl, J. M. *et al.* Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* **64**, 7002–10 (2004).
150. Recio, J. A. *et al.* Ink4a/arf deficiency promotes ultraviolet radiation-induced melanomagenesis. *Cancer Res.* **62**, 6724–30 (2002).
151. Regl, G. *et al.* The zinc-finger transcription factor GLI2 antagonizes contact inhibition and differentiation of human epidermal cells. *Oncogene* **23**, 1263–74 (2004).
152. De Winter, S., Vink, A. A., Roza, L. & Pavel, S. Solar-simulated skin adaptation and its effect on subsequent UV-induced epidermal DNA damage. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 678–82 (2001).
153. Yamaguchi, Y. *et al.* Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J.* **20**, 1486–8 (2006).
154. Pavey, S., Russell, T. & Gabrielli, B. G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation. *Oncogene* **20**, 6103–10 (2001).
155. Kawagishi, N., Hashimoto, Y., Takahashi, H., Ishida-Yamamoto, a & Iizuka, H. Epidermal cell kinetics of pig skin in vivo following UVB irradiation: apoptosis induced by UVB is enhanced in hyperproliferative skin condition. *J. Dermatol. Sci.* **18**, 43–53 (1998).
156. Lu, Y. P. *et al.* Time course for early adaptive responses to ultraviolet B light in the epidermis of SKH-1 mice. *Cancer Res.* **59**, 4591–602 (1999).

157. García, M. *et al.* In vivo assessment of acute UVB responses in normal and Xeroderma Pigmentosum (XP-C) skin-humanized mouse models. *Am. J. Pathol.* **177**, 865–72 (2010).
158. Rijnkels, J. M., Whiteley, L. O. & Beijersbergen van Henegouwen, G. M. Time and dose-related ultraviolet B damage in viable pig skin explants held in a newly developed organ culture system. *Photochem. Photobiol.* **73**, 499–504 (2001).
159. Lee, J. K., Kim, J. H., Nam, K. T. & Lee, S. H. Molecular events associated with apoptosis and proliferation induced by ultraviolet-B radiation in the skin of hairless mice. *J. Dermatol. Sci.* **32**, 171–179 (2003).
160. Del Bino, S. *et al.* Ultraviolet B induces hyperproliferation and modification of epidermal differentiation in normal human skin grafted on to nude mice. *Br. J. Dermatol.* **150**, 658–67 (2004).
161. Lavin, M. F. ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26**, 7749–58 (2007).
162. Nam, E. a & Cortez, D. ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem. J.* **436**, 527–36 (2011).
163. Durocher, D. & Jackson, S. P. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 225–31 (2001).
164. Yang, J., Yu, Y., Hamrick, H. E. & Duerksen-Hughes, P. J. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* **24**, 1571–80 (2003).
165. Smith, G. C. *et al.* Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11134–9 (1999).
166. Unsal-Kaçmaz, K., Makhov, A. M., Griffith, J. D. & Sancar, A. Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6673–8 (2002).
167. Canman, C. E. *et al.* Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281**, 1677–9 (1998).
168. Matsuoka, S. *et al.* Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10389–94 (2000).
169. Zhao, H. & Piwnicka-Worms, H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4129–39 (2001).

170. Yajima, H., Lee, K.-J., Zhang, S., Kobayashi, J. & Chen, B. P. C. DNA double-strand break formation upon UV-induced replication stress activates ATM and DNA-PKcs kinases. *J. Mol. Biol.* **385**, 800–10 (2009).
171. Suzuki, K., Kodama, S. & Watanabe, M. Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* **274**, 25571–5 (1999).
172. Lee, J.-H. & Paull, T. T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**, 551–4 (2005).
173. Glover, J. N. M., Williams, R. S. & Lee, M. S. Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 579–85 (2004).
174. Bunz Fred. *Molecular Determinants of Radiation Response*. 35–52 (Springer, 2011). doi:10.1007/978-1-4419-8044-1_2
175. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. a, Unsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 39–85 (2004).
176. Barlow, C. *et al.* Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* **86**, 159–71 (1996).
177. Hannan, M. A. *et al.* Deficiency in the repair of UV-induced DNA damage in human skin fibroblasts compromised for the ATM gene. *Carcinogenesis* **23**, 1617–24 (2002).
178. Auclair, Y., Rouget, R., Affar, E. B. & Drobetsky, E. a. ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17896–901 (2008).
179. Yajima, H., Lee, K.-J. & Chen, B. P. C. ATR-dependent phosphorylation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in response to UV-induced replication stress. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7520–8 (2006).
180. Cowan, K. J. & Storey, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J. Exp. Biol.* **206**, 1107–1115 (2003).
181. López-Camarillo, C. *et al.* Protein Kinases and Transcription Factors Activation in Response to UV-Radiation of Skin: Implications for Carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 142–72 (2012).
182. Bode, A. M. & Dong, Z. Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci. STKE* **2003**, RE2 (2003).
183. Hui, L., Bakiri, L., Stepniak, E. & Wagner, E. F. p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* **6**, 2429–33 (2007).

184. Jinlian, L., Yingbin, Z. & Chunbo, W. p38 MAPK in regulating cellular responses to ultraviolet radiation. *J. Biomed. Sci.* **14**, 303–12 (2007).
185. Thornton, T. M. & Rincon, M. Non-Classical P38 Map Kinase Functions: Cell Cycle Checkpoints and Survival. **5**, (2009).
186. Galibert, M. D., Carreira, S. & Goding, C. R. The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *EMBO J.* **20**, 5022–31 (2001).
187. Corre, S. *et al.* UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J. Biol. Chem.* **279**, 51226–33 (2004).
188. Ashida, M., Bito, T., Budiyo, A., Ichihashi, M. & Ueda, M. Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in HaCaT keratinocytes after UVB. *Exp. Dermatol.* **12**, 445–52 (2003).
189. Rosette, C. & Karin, M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* **274**, 1194–7 (1996).
190. Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A. & Herrlich, P. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* **15**, 5314–25 (1996).
191. Lukas, J., Lukas, C. & Bartek, J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)*. **3**, 997–1007
192. Flemington, E. K., Speck, S. H. & Kaelin, W. G. E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 6914–8 (1993).
193. Ohtani, K., DeGregori, J. & Nevins, J. R. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 12146–50 (1995).
194. Schulze, a *et al.* Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11264–8 (1995).
195. Lundberg, A. S. & Weinberg, R. A. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 753–61 (1998).
196. Fabbro, M. *et al.* BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* **279**, 31251–8 (2004).
197. Vrouwe, M. G., Pines, A., Overmeer, R. M., Hanada, K. & Mullenders, L. H. F. UV-induced photolesions elicit ATR-kinase-dependent signaling in non-cycling

- cells through nucleotide excision repair-dependent and -independent pathways. *J. Cell Sci.* **124**, 435–46 (2011).
198. Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y. & Prives, C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**, 325–34 (1997).
 199. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805–16 (1993).
 200. Woo, R. a & Poon, R. Y. C. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* **2**, 316–24 (2003).
 201. Tasat, D. R. & Sebastianyakisich, J. *DNA Damage Repair, Repair Mechanisms and Aging*. Nova Science Publishers, 71–96 (2010).
 202. Takisawa, H., Mimura, S. & Kubota, Y. Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 690–6 (2000).
 203. Kaufmann, W. K. The human intra-S checkpoint response to UVC-induced DNA damage. *Carcinogenesis* **31**, 751–65 (2010).
 204. Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R. G., Bartek, J. & Lukas, J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **410**, 842–7 (2001).
 205. Reinhardt, H. C., Aslanian, A. S., Lees, J. a & Yaffe, M. B. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* **11**, 175–89 (2007).
 206. Mailand, N. *et al.* Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288**, 1425–9 (2000).
 207. Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F. & Draetta, G. F. Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep.* **1**, 71–9 (2000).
 208. Mailand, N. *et al.* Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J.* **21**, 5911–20 (2002).
 209. Bulavin, D. V *et al.* Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* **411**, 102–7 (2001).
 210. Zhan, Q. *et al.* Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* **18**, 2892–900 (1999).

211. Hermeking, H. *et al.* 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* **1**, 3–11 (1997).
212. Park, J. S. *et al.* Involvement of DNA-dependent protein kinase in UV-induced replication arrest. *J. Biol. Chem.* **274**, 32520–7 (1999).
213. She, Q. B., Chen, N. & Dong, Z. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J. Biol. Chem.* **275**, 20444–9 (2000).
214. Bulavin, D. V *et al.* Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J.* **18**, 6845–54 (1999).
215. Jin, S. *et al.* Gadd45a contributes to p53 stabilization in response to DNA damage. *Oncogene* **22**, 8536–40 (2003).
216. Manke, I. a *et al.* MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol. Cell* **17**, 37–48 (2005).
217. Raman, M., Earnest, S., Zhang, K., Zhao, Y. & Cobb, M. H. TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage. *EMBO J.* **26**, 2005–14 (2007).
218. Nospikel, T. DNA repair in mammalian cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 994–1009 (2009).
219. Sugasawa, K. *et al.* Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol. Cell* **2**, 223–32 (1998).
220. Maillard, O., Solyom, S. & Naegeli, H. An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair. *PLoS Biol.* **5**, e79 (2007).
221. Sugasawa, K. *et al.* Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6924–31 (1997).
222. Araki, M. *et al.* Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* **276**, 18665–72 (2001).
223. Sugasawa, K. *et al.* UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* **121**, 387–400 (2005).
224. Bradsher, J. *et al.* CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol. Cell* **10**, 819–29 (2002).

225. Groisman, R. *et al.* The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* **113**, 357–67 (2003).
226. Baron, Y. *et al.* USF-1 is critical for maintaining genome integrity in response to UV-induced DNA photolesions. *PLoS Genet.* **8**, e1002470 (2012).
227. Ichihashi, M. *et al.* UV-induced skin damage. *Toxicology* **189**, 21–39 (2003).
228. Schaeffer, L. *et al.* DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* **260**, 58–63 (1993).
229. Winkler, G. S. *et al.* TFIIH with Inactive XPD Helicase Functions in Transcription Initiation but Is Defective in DNA Repair. *J. Biol. Chem.* **275**, 4258–4266 (2000).
230. Coin, F., Oksenych, V. & Egly, J.-M. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol. Cell* **26**, 245–56 (2007).
231. O'Donovan, A., Davies, A. A., Moggs, J. G., West, S. C. & Wood, R. D. XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature* **371**, 432–5 (1994).
232. Mu, D., Hsu, D. S. & Sancar, A. Reaction Mechanism of Human DNA Repair Excision Nuclease. *J. Biol. Chem.* **271**, 8285–8294 (1996).
233. Popanda, O. & Thielmann, H. W. The function of DNA polymerases in DNA repair synthesis of ultraviolet-irradiated human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1129**, 155–60 (1992).
234. Shivji, K. K., Kenny, M. K. & Wood, R. D. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* **69**, 367–74 (1992).
235. Moser, J. *et al.* Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol. Cell* **27**, 311–23 (2007).
236. Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8876–80 (1995).
237. Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. Expression of Wild-type p53 Is Required for Efficient Global Genomic Nucleotide Excision Repair in UV-irradiated Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**, 28073–28080 (1997).
238. Ford, J. M., Baron, E. L. & Hanawalt, P. C. Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide

- excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation. *Cancer Res.* **58**, 599–603 (1998).
239. Barley, R. D., Enns, L., Paterson, M. C. & Mirzayans, R. Aberrant p21WAF1-dependent growth arrest as the possible mechanism of abnormal resistance to ultraviolet light cytotoxicity in Li-Fraumeni syndrome fibroblast strains heterozygous for TP53 mutations. *Oncogene* **17**, 533–43 (1998).
 240. Wani, M. a, Zhu, Q. Z., El-Mahdy, M. & Wani, a a. Influence of p53 tumor suppressor protein on bias of DNA repair and apoptotic response in human cells. *Carcinogenesis* **20**, 765–72 (1999).
 241. Bowman, K. K., Sicard, D. M., Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. Reduced global genomic repair of ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in simian virus 40-transformed human cells. *Mol. Carcinog.* **29**, 17–24 (2000).
 242. Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C. & Chu, G. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 424–8 (1999).
 243. Tang, J. Y., Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C. & Chu, G. Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. *Mol. Cell* **5**, 737–44 (2000).
 244. Fitch, M. E. p53 responsive nucleotide excision repair gene products p48 and XPC, but not p53, localize to sites of UV-irradiation-induced DNA damage, in vivo. *Carcinogenesis* **24**, 843–850 (2003).
 245. Smith, M. L. *et al.* p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3705–14 (2000).
 246. Mathonnet, G. *et al.* UV wavelength-dependent regulation of transcription-coupled nucleotide excision repair in p53-deficient human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7219–24 (2003).
 247. DANIELS, F., BROPHY, D. & LOBITZ, W. C. Histochemical responses of human skin following ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol.* **37**, 351–7 (1961).
 248. Kumakiri, M., Hashimoto, K. & Willis, I. Biologic changes due to long-wave ultraviolet irradiation on human skin: ultrastructural study. *J. Invest. Dermatol.* **69**, 392–400 (1977).
 249. Ziegler, A. *et al.* Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* **372**, 773–6
 250. Plettenberg, A. *et al.* Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture. *Am. J. Pathol.* **146**, 651–9 (1995).

251. Gniadecki, R., Hansen, M. & Wulf, H. C. Two pathways for induction of apoptosis by ultraviolet radiation in cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **109**, 163–9 (1997).
252. Qin, J.-Z., Bacon, P. E., Chaturvedi, V., Bonish, B. & Nickoloff, B. J. Pathways involved in proliferating, senescent and immortalized keratinocyte cell death mediated by two different TRAIL preparations. *Exp. Dermatol.* **11**, 573–83 (2002).
253. Wolf, P., Cox, P., Yarosh, D. B. & Kripke, M. L. Sunscreens and T4N5 liposomes differ in their ability to protect against ultraviolet-induced sunburn cell formation, alterations of dendritic epidermal cells, and local suppression of contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 287–92 (1995).
254. Beissert, S. & Granstein, R. D. UV-induced cutaneous photobiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **31**, 381–404 (1996).
255. Schwarz, T. & Beissert, S. Milestones in photoimmunology. *J. Invest. Dermatol.* **133**, E7–E10 (2013).
256. Ashkenazi, a. & Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305–8 (1998).
257. Igney, F. H. & Krammer, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 277–88 (2002).
258. Grant Dewson, Ruth M Kluck, (Molecular Genetics of Cancer Division, Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, A. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health Cytoskelet.* **2010**, 9 – 22 (2010).
259. Kulms, D. *et al.* Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7974–9 (1999).
260. Aragane, Y. *et al.* Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J. Cell Biol.* **140**, 171–82 (1998).
261. Schwarz, A. *et al.* Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 922–7 (1995).
262. Sayama, K., Yonehara, S., Watanabe, Y. & Miki, Y. Expression of Fas antigen on keratinocytes in vivo and induction of apoptosis in cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 330–4 (1994).
263. Rehemtulla, a. Ultraviolet Radiation-induced Apoptosis Is Mediated by Activation of CD-95 (Fas/APO-1). *J. Biol. Chem.* **272**, 25783–25786 (1997).

264. Leverkus, M., Yaar, M. & Gilchrist, B. a. Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp. Cell Res.* **232**, 255–62 (1997).
265. Caricchio, R., Reap, E. a & Cohen, P. L. Fas/Fas ligand interactions are involved in ultraviolet-B-induced human lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.* **161**, 241–51 (1998).
266. Hill, L. L. Fas Ligand: A Sensor for DNA Damage Critical in Skin Cancer Etiology. *Science (80-.).* **285**, 898–900 (1999).
267. Gillardon, F., Moll, I., Meyer, M. & Michaelidis, T. M. Alterations in cell death and cell cycle progression in the UV-irradiated epidermis of bcl-2-deficient mice. *Cell Death Differ.* **6**, 55–60 (1999).
268. Washio, F., Ueda, M., Ito, a & Ichihashi, M. Higher susceptibility to apoptosis following ultraviolet B irradiation of xeroderma pigmentosum fibroblasts is accompanied by upregulation of p53 and downregulation of bcl-2. *Br. J. Dermatol.* **140**, 1031–7 (1999).
269. Kulms, D. & Schwarz, T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **16**, 195–201 (2000).
270. Paz, M. L., González Maglio, D. H., Weill, F. S., Bustamante, J. & Leoni, J. Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **24**, 115–22 (2008).
271. Gonzalez Maglio, D. H. *et al.* Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **21**, 311–7 (2005).
272. Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D. & Green, D. R. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* **17**, 37–49 (1998).
273. Benchimol, S. P53-Dependent Pathways of Apoptosis. *Cell Death Differ.* **8**, 1049–51 (2001).
274. Qin, J. *et al.* Regulation of apoptosis by p53 in UV-irradiated human epidermis, psoriatic plaques and senescent keratinocytes. *Oncogene* **21**, 2991–3002 (2002).
275. Chaturvedi, V. *et al.* Knockdown of p53 levels in human keratinocytes accelerates Mcl-1 and Bcl-x(L) reduction thereby enhancing UV-light induced apoptosis. *Oncogene* **24**, 5299–312 (2005).
276. Villunger, A. *et al.* p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**, 1036–8 (2003).

277. Jeffers, J. R. *et al.* Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* **4**, 321–8 (2003).
278. Shibue, T. *et al.* Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev.* **17**, 2233–8 (2003).
279. Cuadrado, A. *et al.* A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *EMBO J.* **26**, 2115–26 (2007).
280. Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J. & Murphy, M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J. Biol. Chem.* **277**, 3247–57 (2002).
281. Khoury, M. P. & Bourdon, J.-C. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000927 (2010).
282. Hildesheim, J. *et al.* Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Res.* **62**, 7305–15 (2002).
283. Hildesheim, J. *et al.* Gadd45a regulates matrix metalloproteinases by suppressing DeltaNp63alpha and beta-catenin via p38 MAP kinase and APC complex activation. *Oncogene* **23**, 1829–37 (2004).
284. Liefer, K. M. *et al.* Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis. *Cancer Res.* **60**, 4016–20 (2000).
285. Mihara, M. *et al.* p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* **11**, 577–90 (2003).
286. Kobayashi, N. *et al.* Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 685–9 (1993).
287. Del Bino, S., Sok, J., Bessac, E. & Bernerd, F. Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type. *Pigment Cell Res.* **19**, 606–14 (2006).
288. Yamaguchi, Y. *et al.* Cyclobutane pyrimidine dimer formation and p53 production in human skin after repeated UV irradiation. *Exp. Dermatol.* **17**, 916–24 (2008).
289. Prota, G. Melanins, melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint. *Pigment Cell Res.* **13**, 283–93 (2000).
290. Brenner, M. *et al.* Long-lasting molecular changes in human skin after repetitive in situ UV irradiation. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 1002–11 (2009).

291. Thody, A. J. *et al.* Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 340–4 (1991).
292. SEIJI, M., FITZPATRICK, T. B. & BIRBECK, M. S. The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **36**, 243–52 (1961).
293. Hunt, G., Kyne, S., Wakamatsu, K., Ito, S. & Thody, A. J. Nle4DPhe7 alpha-melanocyte-stimulating hormone increases the eumelanin:phaeomelanin ratio in cultured human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 83–5 (1995).
294. Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. & Wortsman, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* **84**, 1155–228 (2004).
295. Quevedo, W. C. & Holstein, T. J. in *Pigment. Syst.* 61–90 (Blackwell Publishing Ltd, 2007). doi:10.1002/9780470987100.ch3
296. Nordlund, J. J. & Ortonne, J.-P. in *Pigment. Syst.* 504–520 (Blackwell Publishing Ltd, 2007). doi:10.1002/9780470987100.ch27
297. Ito, S. IFPCS Presidential Lecture A Chemist ' s View of Melanogenesis. *Pigment Cell Res.* **16**, 230–236 (2003).
298. Yamaguchi, Y., Hearing, V. J. & Manuscript, A. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* **35**, 193–199 (2010).
299. LERNER, A. B. & FITZPATRICK, T. B. Mammalian tyrosinase; preparation and properties. *J. Biol. Chem.* **178**, 185–95 (1949).
300. Müller, G., Ruppert, S., Schmid, E. & Schütz, G. Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. *EMBO J.* **7**, 2723–2730 (1988).
301. Halaban, R. *et al.* Endoplasmic reticulum retention is a common defect associated with tyrosinase-negative albinism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5889–94 (2000).
302. Park, K. C. *et al.* Molecular Analyses of a Tyrosinase-negative Albino Family. *Am. J. Hum. Genet.* **52**, 406–413 (1993).
303. Spritz, R. A., Strunk, K. M., Giebel, L. B. & King, R. A. Detection of mutations in the tyrosinase gene in a patient with type IA oculocutaneous albinism. *N. Engl. J. Med.* **322**, 1724–8 (1990).
304. Walter C. Quevedo and Thomas J. Holstein, Richard A. Spritz, Raymond E. Boissy, Marjan Huizing and William A. Gahl, Glynis A. Scott, H. Randolph Byers, Vincent J. Hearing, William S. Oetting and Vijayasaratthi Setaluri, Murray H. Brilliant, Kazuhisa Takeda, H. C. and J.-P. O. & Raymond E. Boissy, Marjan Huizing and William A. Gahl, Vincent J. Hearing, William S. Oetting and

- Vijayasaradhi Setaluri, Murray H. Brilliant, Kazuhisa Takeda and Shigeki Shibahara, Kazuhisa Takeda and Shigeki Shibahara, Francisco Solano and José C. Garcí, R. H. and G. M. *The Pigmentary System. Pigment. Syst.* (Blackwell Publishing Ltd, 2006). doi:10.1002/9780470987100
305. Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D. C. & Hearing, V. J. Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein). *J. Biol. Chem.* **273**, 31801–5 (1998).
 306. Solano, F. & García-Borrón, J. C. in *Pigment. Syst.* 261–281 (Blackwell Publishing Ltd, 2007). doi:10.1002/9780470987100.ch14
 307. Hearing, V. J. in *Pigment. Syst.* 191–212 (Blackwell Publishing Ltd, 2007). doi:10.1002/9780470987100.ch10
 308. Brilliant, M. H. in *Pigment. Syst.* 230–241 (Blackwell Publishing Ltd, 2007). doi:10.1002/9780470987100.ch12
 309. Berson, J. F., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G. & Marks, M. S. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3451–3464 (2001).
 310. Berson, J. F. *et al.* Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J. Cell Biol.* **161**, 521–533 (2003).
 311. Kushimoto, T. *et al.* A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10698–10703 (2001).
 312. Sitaram, A. & Marks, M. S. Mechanisms of protein delivery to melanosomes in pigment cells. *Physiology (Bethesda)*. **27**, 85–99 (2012).
 313. Orlow, S. J., Boissy, R. E., Moran, D. J. & Pifko-Hirst, S. Subcellular distribution of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1: implications for melanosomal biogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 55–64 (1993).
 314. Wu, X., Bowers, B., Wei, Q., Kocher, B. & Hammer, J. a. Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. *J. Cell Sci.* **110** (Pt 7, 847–859 (1997).
 315. Wu, X., Wang, F., Rao, K., Sellers, J. R. & Hammer, J. A. Rab27a is an essential component of melanosome receptor for myosin Va. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1735–49 (2002).
 316. Edgar, a J. & Bennett, J. P. Inhibition of dendrite formation in mouse melanocytes transiently transfected with antisense DNA to myosin Va. *J. Anat.* **195** (Pt 2), 173–184 (1999).

317. Scott, G. A. & Cassidy, L. Rac1 mediates dendrite formation in response to melanocyte stimulating hormone and ultraviolet light in a murine melanoma model. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 243–50 (1998).
318. Scott, G. & Leopardi, S. The cAMP signaling pathway has opposing effects on Rac and Rho in B16F10 cells: implications for dendrite formation in melanocytic cells. *Pigment Cell Res.* **16**, 139–148 (2003).
319. Byers, H. R., Yaar, M., Eller, M. S., Jalbert, N. L. & Gilchrest, B. a. Role of cytoplasmic dynein in melanosome transport in human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 990–997 (2000).
320. Virador, V. M. *et al.* Influence of alpha-melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. *FASEB J.* **16**, 105–7 (2002).
321. Scott, G. *et al.* The proteinase-activated receptor-2 mediates phagocytosis in a Rho-dependent manner in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 529–41 (2003).
322. Seiberg, M. *et al.* The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp. Cell Res.* **254**, 25–32 (2000).
323. Sharlow, E. R. *et al.* The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 1, 3093–101 (2000).
324. Yajima, I. *et al.* An L1 element intronic insertion in the black-eyed white (Mitf mi-bw) gene : the loss of a single Mitf isoform responsible for the pigmentary defect and inner ear deafness. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1431–1442 (1999).
325. Mazurkiewicz, J. E., Corliss, D. & Slominski, a. Spatiotemporal Expression, Distribution, and Processing of POMC and POMC-derived Peptides in Murine Skin. *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 905–914 (2000).
326. Chakraborty, A., Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J. & Pawelek, J. Ultraviolet B and melanocyte-stimulating hormone (MSH) stimulate mRNA production for alpha MSH receptors and proopiomelanocortin-derived peptides in mouse melanoma cells and transformed keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 655–9 (1995).
327. Chakraborty, A. K. *et al.* Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim. Biophys. Acta* **1313**, 130–8 (1996).
328. Schauer, E. *et al.* Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* **93**, 2258–2262 (1994).
329. Rousseau, K. *et al.* Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis. *FASEB J.* **21**, 1844–56 (2007).

330. Mountjoy, K. G., Robbins, L. S., Mortrud, M. T. & Cone, R. D. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* **257**, 1248–1251 (1992).
331. Gantz, I. *et al.* Molecular Cloning of a Novel Melanocortin Receptor*. *J. Biol. Chem.* **268**, 8246–50 (1993).
332. Körner, A. & Pawelek, J. Activation of melanoma tyrosinase by a cyclic AMP-dependent protein kinase in a cell-free system. *Nature* **267**, 444–7 (1977).
333. Wong, G., Pawelek, J., Sansone, M. & Morowitz, J. Response of mouse melanoma cells to melanocyte stimulating hormone. *Nature* **248**, 351–4 (1974).
334. Park, H. Y., Russakovsky, V., Ao, Y., Fernandez, E. & Gilchrest, B. A. Alpha-melanocyte stimulating hormone-induced pigmentation is blocked by depletion of protein kinase C. *Exp. Cell Res.* **227**, 70–9 (1996).
335. Gordon, P. R. & Gilchrest, B. A. Human melanogenesis is stimulated by diacylglycerol. *J. Invest. Dermatol.* **93**, 700–2 (1989).
336. Bertolotto, C., Bille, K., Ortonne, J. P. & Ballotti, R. In B16 melanoma cells, the inhibition of melanogenesis by TPA results from PKC activation and diminution of microphthalmia binding to the M-box of the tyrosinase promoter. *Oncogene* **16**, 1665–1670 (1998).
337. Bertolotto, C. *et al.* Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell Biol.* **142**, 827–35 (1998).
338. Bertolotto, C. *et al.* Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 694–702 (1998).
339. Aoki, H. & Moro, O. Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R). *Life Sci.* **71**, 2171–9 (2002).
340. Swope, V. B., Medrano, E. E., Smalara, D. & Abdel-Malek, Z. A. Long-term proliferation of human melanocytes is supported by the physiologic mitogens alpha-melanotropin, endothelin-1, and basic fibroblast growth factor. *Exp. Cell Res.* **217**, 453–9 (1995).
341. Costin, G.-E. & Hearing, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* **21**, 976–94 (2007).
342. Hachiya, A., Kobayashi, T., Takema, Y. & Imokawa, G. Biochemical characterization of endothelin-converting enzyme-1alpha in cultured skin-derived cells and its postulated role in the stimulation of melanogenesis in human epidermis. *J. Biol. Chem.* **277**, 5395–403 (2002).

343. Imokawa, G., Yada, Y. & Miyagishi, M. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J. Biol. Chem.* **267**, 24675–24680 (1992).
344. Hara, M., Yaar, M. & Gilchrest, B. A. Endothelin-1 of keratinocyte origin is a mediator of melanocyte dendricity. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 744–8 (1995).
345. Tada, A. *et al.* Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ.* **9**, 575–84 (1998).
346. Imokawa, G., Yada, Y. & Kimura, M. Signalling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochem. J.* **314** (Pt 1), 305–12 (1996).
347. Funasaka *et al.* Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1 α , interleukin-1 β , endothelin-1 and tumour necrosis factor- α . *Br. J. Dermatol.* **139**, 216–224 (1998).
348. Sato-Jin, K. *et al.* Epistatic connections between microphthalmia-associated transcription factor and endothelin signaling in Waardenburg syndrome and other pigmentary disorders. *FASEB J.* **22**, 1155–1168 (2008).
349. Yada, Y., Higuchi, K. & Imokawa, G. Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 18352–7 (1991).
350. Lin, J. Y. & Fisher, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **445**, 843–50 (2007).
351. Longley, B. J. *et al.* Altered metabolism of mast-cell growth factor (c-kit ligand) in cutaneous mastocytosis. *N. Engl. J. Med.* **328**, 1302–7 (1993).
352. Halaban, R. *et al.* Basic Fibroblast Growth Factor from Human Keratinocytes Is a Natural Mitogen for Melanocytes Evidence that Keratinocytes Synthesize a Mitogen. *J. Cell Biol.* **107**, 1611–1619 (1988).
353. Hachiya, A., Kobayashi, A., Ohuchi, A., Takema, Y. & Imokawa, G. The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 578–86 (2001).
354. D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. & Scott, T. UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 12222–48 (2013).
355. Routaboul, C., Denis, A. & Vinche, A. Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. *Eur. J. Dermatol.* **9**, 95–9 (1999).

356. Bolognia, J., Murray, M. & Pawelek, J. UVB-induced melanogenesis may be mediated through the MSH-receptor system. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 651–6 (1989).
357. Corre, S. *et al.* In vivo and ex vivo UV-induced analysis of pigmentation gene expressions. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 916–8 (2006).
358. Corre, S. & Galibert, M.-D. [USF as a key regulatory element of gene expression]. *Med. Sci. (Paris)*. **22**, 62–7 (2006).
359. Corre, S. & Galibert, M.-D. Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res.* **18**, 337–48 (2005).
360. Corre, S. *et al.* Target gene specificity of USF-1 is directed via p38-mediated phosphorylation-dependent acetylation. *J. Biol. Chem.* **284**, 18851–62 (2009).
361. Mouchet, N. *et al.* In vivo identification of solar radiation-responsive gene network: role of the p38 stress-dependent kinase. *PLoS One* **5**, e10776 (2010).
362. Eller, M. S., Ostrom, K. & Gilchrest, B. a. DNA damage enhances melanogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1087–1092 (1996).
363. Eller, M. S., Maeda, T., Magnoni, C., Atwal, D. & Gilchrest, B. a. Enhancement of DNA repair in human skin cells by thymidine dinucleotides: evidence for a p53-mediated mammalian SOS response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12627–12632 (1997).
364. Gilchrest, B. a & Eller, M. S. DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **4**, 35–40 (1999).
365. Nylander, K. *et al.* Transcriptional activation of tyrosinase and TRP-1 by p53 links UV irradiation to the protective tanning response. *J. Pathol.* **190**, 39–46 (2000).
366. Yang, G. *et al.* Inhibition of PAX3 by TGF-beta modulates melanocyte viability. *Mol. Cell* **32**, 554–563 (2008).
367. Cui, R. *et al.* Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* **128**, 853–864 (2007).
368. Lane, D. P. & Crawford, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261–3 (1979).
369. Linzer, D. I. & Levine, A. J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43–52 (1979).

370. Deleo, A. B. *et al.* Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 2420–4 (1979).
371. Dippold, W. G., Jay, G., DeLeo, a B., Khoury, G. & Old, L. J. P53 Transformation-Related Protein: Detection By Monoclonal Antibody in Mouse and Human Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 1695–9 (1981).
372. Wolf, D. & Rotter, V. Inactivation of p53 gene expression by an insertion of Moloney murine leukemia virus-like DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1402–10 (1984).
373. Maltzman, W. & Czyzyk, L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1689–94 (1984).
374. Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Craig, R. W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **51**, 6304–11 (1991).
375. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–6 (1992).
376. Baker, S. J. *et al.* Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**, 217–21 (1989).
377. Malkin, D. *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**, 1233–8 (1990).
378. Bártek, J. *et al.* Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* **6**, 1699–703 (1991).
379. Donehower, L. A. *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215–21 (1992).
380. Funk, W. D., Pak, D. T., Karas, R. H., Wright, W. E. & Shay, J. W. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2866–71 (1992).
381. el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* **1**, 45–9 (1992).
382. Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L. & Vogelstein, B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **358**, 80–3 (1992).
383. Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D. & Levine, a J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* **7**, 1126–1132 (1993).

384. Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B. & Levine, A. J. Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev.* **8**, 1235–46 (1994).
385. Kubbutat, M. H., Jones, S. N. & Vousden, K. H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299–303 (1997).
386. Celli, J. *et al.* Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* **99**, 143–53 (1999).
387. Yang, A. *et al.* p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714–8 (1999).
388. Yang, a *et al.* P73-Deficient Mice Have Neurological, Pheromonal and Inflammatory Defects But Lack Spontaneous Tumours. *Nature* **404**, 99–103 (2000).
389. Jones, S. N., Roe, a E., Donehower, L. a & Bradley, a. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378**, 206–8 (1995).
390. Parant, J. *et al.* Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat. Genet.* **29**, 92–5 (2001).
391. Grönroos, E., Terentiev, A. a, Punga, T. & Ericsson, J. YY1 inhibits the activation of the p53 tumor suppressor in response to genotoxic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 12165–70 (2004).
392. Yan, C., Lu, D., Hai, T. & Boyd, D. D. Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *EMBO J.* **24**, 2425–35 (2005).
393. Lafarga, V., Cuadrado, A. & Nebreda, A. R. p18(Hamlet) mediates different p53-dependent responses to DNA-damage inducing agents. *Cell Cycle* **6**, 2319–22 (2007).
394. Iwasa, H. *et al.* The RASSF6 tumor suppressor protein regulates apoptosis and the cell cycle via MDM2 protein and p53 protein. *J. Biol. Chem.* **288**, 30320–9 (2013).
395. Gomez-Lazaro, M., Fernandez-Gomez, F. J. & Jordán, J. P53: Twenty Five Years Understanding the Mechanism of Genome Protection. *J. Physiol. Biochem.* **60**, 287–307 (2004).
396. Reinhardt, H. C. & Schumacher, B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet.* **28**, 128–36 (2012).

397. Campbell, C., Quinn, A. G., Angus, B., Farr, P. M. & Rees, J. L. Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. *Cancer Res.* **53**, 2697–9 (1993).
398. Fuchs, S. Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X. & Ronai, Z. Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene* **17**, 2543–7 (1998).
399. Chang, D., Chen, F., Zhang, F., McKay, B. C. & Ljungman, M. Dose-dependent effects of DNA-damaging agents on p53-mediated cell cycle arrest. *Cell Growth Differ.* **10**, 155–62 (1999).
400. Geyer, R. K., Nagasawa, H., Little, J. B. & Maki, C. G. Role and regulation of p53 during an ultraviolet radiation-induced G1 cell cycle arrest. *Cell Growth Differ.* **11**, 149–56 (2000).
401. Tron, V. a *et al.* p53-regulated apoptosis is differentiation dependent in ultraviolet B-irradiated mouse keratinocytes. *Am. J. Pathol.* **153**, 579–85 (1998).
402. Lassam, N. J., From, L. & Kahn, H. J. Overexpression of p53 is a late event in the development of malignant melanoma. *Cancer Res.* **53**, 2235–8 (1993).
403. Borrelli, S. *et al.* p63 regulates the caspase-8-FLIP apoptotic pathway in epidermis. *Cell Death Differ.* **16**, 253–63 (2009).
404. Liu, J. *et al.* TAp63 γ enhances nucleotide excision repair through transcriptional regulation of DNA repair genes. *DNA Repair (Amst)*. **11**, 167–76 (2012).
405. Bourdon, J.-C. *et al.* P53 Isoforms Can Regulate P53 Transcriptional Activity. *Genes Dev.* **19**, 2122–37 (2005).
406. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296–9 (1997).
407. Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Lane, D. P. & Hay, R. T. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8458–67 (2000).
408. O’Keefe, K., Li, H., Zhang, Y. & Keefe, K. O. Nucleocytoplasmic shuttling of p53 is essential for MDM2-mediated cytoplasmic degradation but not ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6396–405 (2003).
409. Johnson, T. M., Hammond, E. M., Giaccia, A. & Attardi, L. D. The p53^{QS} transactivation-deficient mutant shows stress-specific apoptotic activity and induces embryonic lethality. *Nat. Genet.* **37**, 145–52 (2005).
410. Kussie, P. H. *et al.* Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274**, 948–53 (1996).

411. Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H. & Weissman, A. M. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* **275**, 8945–51 (2000).
412. Beckerman, R. & Prives, C. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000935 (2010).
413. Lu, H. & Levine, A. J. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5154–8 (1995).
414. Lill, N. L., Grossman, S. R., Ginsberg, D., DeCaprio, J. & Livingston, D. M. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**, 823–7 (1997).
415. Grossman, S. R. p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2773–8 (2001).
416. Appella, E. & Anderson, C. W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2764–72 (2001).
417. Meek, D. W. & Anderson, C. W. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a000950 (2009).
418. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D. & Pavletich, N. P. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**, 346–55 (1994).
419. Bai, L. & Zhu, W. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *J. Cancer Mol.* **2**, 141–153 (2006).
420. Furlong, E. E., Rein, T. & Martin, F. YY1 and NF1 both activate the human p53 promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify p53 promoter activity. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5933–45 (1996).
421. McLure, K. G. & Lee, P. W. How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J.* **17**, 3342–50 (1998).
422. Wei, J. *et al.* Regulation of p53 tumor suppressor by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **139**, 1333–43 (2010).
423. Zaika, A., Wei, J., Noto, J. & Peek, R. Regulation of the p53 by *Helicobacter pylori*. *Oncotarget* **3**, 1057–8 (2012).
424. Wei, J. *et al.* Pathogenic bacterium *Helicobacter pylori* alters the expression profile of p53 protein isoforms and p53 response to cellular stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2543–50 (2012).
425. Ryan, K. M., Phillips, a C. & Vousden, K. H. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 332–7 (2001).

426. Schmid, P., Lorenz, a, Hameister, H. & Montenarh, M. Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development* **113**, 857–65 (1991).
427. Rogel, A., Popliker, M., Webb, C. G. & Oren, M. p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2851–5 (1985).
428. Weinberg, W. C., Azzoli, C. G., Chapman, K., Levine, A. J. & Yuspa, S. H. p53-mediated transcriptional activity increases in differentiating epidermal keratinocytes in association with decreased p53 protein. *Oncogene* **10**, 2271–9 (1995).
429. Healy, E. *et al.* Dissociation of erythema and p53 protein expression in human skin following UVB irradiation, and induction of p53 protein and mRNA following application of skin irritants. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 493–9 (1994).
430. Liu, M., Dhanwada, K. R., Birt, D. F., Hecht, S. & Pelling, J. C. Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis* **15**, 1089–92 (1994).
431. Komarova, E. a, Christov, K., Faerman, a I. & Gudkov, a V. Different impact of p53 and p21 on the radiation response of mouse tissues. *Oncogene* **19**, 3791–8 (2000).
432. Mirzayans, R., Enns, L., Dietrich, K., Barley, R. D. & Paterson, M. C. Faulty DNA polymerase delta/epsilon-mediated excision repair in response to gamma radiation or ultraviolet light in p53-deficient fibroblast strains from affected members of a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Carcinogenesis* **17**, 691–8 (1996).
433. Saldaña-Meyer, R. & Recillas-Targa, F. Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Epigenetics* **6**, 1068–77 (2011).
434. Bruins, W. *et al.* Increased sensitivity to UV radiation in mice with a p53 point mutation at Ser389. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8884–94 (2004).
435. Li, G., Mitchell, D. L., Ho, V. C., Reed, J. C. & Tron, V. a. Decreased DNA repair but normal apoptosis in ultraviolet-irradiated skin of p53-transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **148**, 1113–23 (1996).
436. Ikehata, H. *et al.* Influences of p53 deficiency on the apoptotic response, DNA damage removal and mutagenesis in UVB-exposed mouse skin. *Mutagenesis* **25**, 397–405 (2010).
437. Tuck, S. P. & Crawford, L. Characterization of the human p53 gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2163–72 (1989).
438. Wu, H. & Lozano, G. NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J. Biol. Chem.* **269**, 20067–74 (1994).

439. Brink, N., Szamel, M., Young, A. R., Wittern, K. P. & Bergemann, J. Comparative quantification of IL-1 β , IL-10, IL-10r, TNF α and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *Inflamm. Res.* **49**, 290–6 (2000).
440. Szoltysek, K. *et al.* TNF α -induced activation of NF κ B protects against UV-induced apoptosis specifically in p53-proficient cells. *Acta Biochim. Pol.* **55**, 741–8 (2008).
441. Noda, a, Toma-Aiba, Y. & Fujiwara, Y. A unique, short sequence determines p53 gene basal and UV-inducible expression in normal human cells. *Oncogene* **19**, 21–31 (2000).
442. Li, C. *et al.* The critical role of the PE21 element in oncostatin M-mediated transcriptional repression of the p53 tumor suppressor gene in breast cancer cells. *Oncogene* **20**, 8193–202 (2001).
443. Chuang, J.-C. *et al.* Docetaxel and 5-fluorouracil induce human p53 tumor suppressor gene transcription via a short sequence at core promoter element. *Toxicol. In Vitro* **26**, 678–85 (2012).
444. Reisman, D. & Rotter, V. The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 tumor suppressor gene. *Nucleic Acids Res.* **21**, 345–50 (1993).
445. Hale, T. K. & Braithwaite, A. W. Identification of an upstream region of the mouse p53 promoter critical for transcriptional expression. *Nucleic Acids Res.* **23**, 663–9 (1995).
446. Furlong, E. E., Rein, T. & Martin, F. YY1 and NF1 both activate the human p53 promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify p53 promoter activity. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5933–45 (1996).
447. Reisman, D., Elkind, N. B., Roy, B., Beamon, J. & Rotter, V. c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ.* **4**, 57–65 (1993).
448. Roy, B., Beamon, J., Balint, E. & Reisman, D. Transactivation of the human p53 tumor suppressor gene by c-Myc/Max contributes to elevated mutant p53 expression in some tumors. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7805–15 (1994).
449. Raman, V. *et al.* Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* **405**, 974–8 (2000).
450. Stuart, E. T., Haffner, R., Oren, M. & Gruss, P. Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. *EMBO J.* **14**, 5638–45 (1995).
451. Soto-Reyes, E. & Recillas-Targa, F. Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines. *Oncogene* **29**, 2217–27 (2010).

452. Kruse, J.-P. & Gu, W. Modes of p53 regulation. *Cell* **137**, 609–22 (2009).
453. Kaeser, M. D. & Iggo, R. D. Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 95–100 (2002).
454. Szak, S. T., Mays, D. & Pietenpol, J. A. Kinetics of p53 binding to promoter sites in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3375–86 (2001).
455. Laptenko, O., Beckerman, R., Freulich, E. & Prives, C. p53 binding to nucleosomes within the p21 promoter in vivo leads to nucleosome loss and transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10385–90 (2011).
456. Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y. & Gu, W. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* **133**, 612–26 (2008).
457. Arva, N. C. *et al.* A chromatin-associated and transcriptionally inactive p53-Mdm2 complex occurs in mdm2 SNP309 homozygous cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 26776–87 (2005).
458. Ohkubo, S., Tanaka, T., Taya, Y., Kitazato, K. & Prives, C. Excess HDM2 impacts cell cycle and apoptosis and has a selective effect on p53-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* **281**, 16943–50 (2006).
459. Wade, M., Wang, Y. V & Wahl, G. M. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol.* **20**, 299–309 (2010).
460. Wang, X. p53 regulation: teamwork between RING domains of Mdm2 and MdmX. *Cell Cycle* **10**, 4225–9 (2011).
461. Ringshausen, I., O'Shea, C. C., Finch, A. J., Swigart, L. B. & Evan, G. I. Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. *Cancer Cell* **10**, 501–14 (2006).
462. Saville, M. K. *et al.* Regulation of p53 by the ubiquitin-conjugating enzymes UbcH5B/C in vivo. *J. Biol. Chem.* **279**, 42169–81 (2004).
463. Xirodimas, D. P., Stephen, C. W. & Lane, D. P. Cocompartmentalization of p53 and Mdm2 is a major determinant for Mdm2-mediated degradation of p53. *Exp. Cell Res.* **270**, 66–77 (2001).
464. Lee, J. T. & Gu, W. The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death Differ.* **17**, 86–92 (2010).
465. Chan, W. M. *et al.* Ubiquitination of p53 at multiple sites in the DNA-binding domain. *Mol. Cancer Res.* **4**, 15–25 (2006).
466. Li, M. *et al.* Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* **302**, 1972–5 (2003).

467. Linares, L. K., Hengstermann, A., Ciechanover, A., Müller, S. & Scheffner, M. HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12009–14 (2003).
468. Saucedo, L. J. Multiple Murine Double Minute Gene 2 (MDM2) Proteins Are Induced by Ultraviolet Light. *J. Biol. Chem.* **274**, 8161–8168 (1999).
469. Zhao, B. *et al.* p53 mediates the negative regulation of MDM2 by orphan receptor TR3. *EMBO J.* **25**, 5703–15 (2006).
470. Wu, L. & Levine, a J. Differential regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 genes after high-dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene. *Mol. Med.* **3**, 441–51 (1997).
471. Zeng, X., Keller, D., Wu, L. & Lu, H. UV but not gamma irradiation accelerates p53-induced apoptosis of teratocarcinoma cells by repressing MDM2 transcription. *Cancer Res.* **60**, 6184–8 (2000).
472. Lees-miller, S. P., Sakaguchi, K., Ullrich, S. J., Appella, E. & Anderson, C. W. Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5041–9 (1992).
473. Chao, C. *et al.* Cell type- and promoter-specific roles of Ser18 phosphorylation in regulating p53 responses. *J. Biol. Chem.* **278**, 41028–33 (2003).
474. Sluss, H. K., Armata, H., Gallant, J. & Jones, S. N. Phosphorylation of serine 18 regulates distinct p53 functions in mice. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 976–84 (2004).
475. MacPherson, D. *et al.* Defective apoptosis and B-cell lymphomas in mice with p53 point mutation at Ser 23. *EMBO J.* **23**, 3689–99 (2004).
476. Shinozaki, T., Nota, A., Taya, Y. & Okamoto, K. Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export. *Oncogene* **22**, 8870–80 (2003).
477. Khosravi, R. *et al.* Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14973–7 (1999).
478. Hjerrild, M. *et al.* serine-267 by protein kinase CK2 in vitro and in cultured cells. **356**, 347–356 (2001).
479. Feng, J. *et al.* Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 35510–7 (2004).
480. Virolle, T. *et al.* The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1124–8 (2001).

481. Freeman, D. J. *et al.* PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* **3**, 117–30 (2003).
482. Ming, M. *et al.* PTEN positively regulates UVB-induced DNA damage repair. *Cancer Res.* **71**, 5287–95 (2011).
483. Grossman, S. R. *et al.* p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol. Cell* **2**, 405–15 (1998).
484. Ito, a *et al.* p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J.* **20**, 1331–40 (2001).
485. Grossman, S. R. *et al.* Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* **300**, 342–4 (2003).
486. Ferreon, J. C. *et al.* Cooperative regulation of p53 by modulation of ternary complex formation with CBP/p300 and HDM2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 6591–6 (2009).
487. Wang, X., Taplick, J., Geva, N. & Oren, M. Inhibition of p53 degradation by Mdm2 acetylation. *FEBS Lett.* **561**, 195–201 (2004).
488. Lee, C., Smith, B. A., Bandyopadhyay, K. & Gjerset, R. A. DNA damage disrupts the p14ARF-B23(nucleophosmin) interaction and triggers a transient subnuclear redistribution of p14ARF. *Cancer Res.* **65**, 9834–42 (2005).
489. Llanos, S., Clark, P. A., Rowe, J. & Peters, G. Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* **3**, 445–52 (2001).
490. Krippner-Heidenreich, A. *et al.* Caspase-dependent regulation and subcellular redistribution of the transcriptional modulator YY1 during apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3704–14 (2005).
491. Sui, G. *et al.* Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell* **117**, 859–72 (2004).
492. Lu, D., Wolfgang, C. D. & Hai, T. Activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, suppresses Ras-stimulated tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **281**, 10473–81 (2006).
493. Hermeking, H. & Benzinger, A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 183–92 (2006).
494. Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**, 616–20 (1999).

495. Mo, P., Wang, H., Lu, H., Boyd, D. D. & Yan, C. MDM2 mediates ubiquitination and degradation of activating transcription factor 3. *J. Biol. Chem.* **285**, 26908–15 (2010).
496. Yang, H.-Y. *et al.* Roles for negative cell regulator 14-3-3sigma in control of MDM2 activities. *Oncogene* **26**, 7355–62 (2007).
497. An, W. G. *et al.* Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* **392**, 405–8 (1998).
498. Li, Y., Bi, Z., Yan, B. & Wan, Y. UVB radiation induces expression of HIF-1alpha and VEGF through the EGFR/PI3K/DEC1 pathway. *Int. J. Mol. Med.* **18**, 713–9 (2006).
499. Hammond, E. M., Denko, N. C., Dorie, M. J., Abraham, R. T. & Giaccia, A. J. Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1834–43 (2002).
500. Chen, D., Li, M., Luo, J. & Gu, W. Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J. Biol. Chem.* **278**, 13595–8 (2003).
501. Legube, G. *et al.* Role of the histone acetyl transferase Tip60 in the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 44825–33 (2004).
502. Buschmann, T. *et al.* Stabilization and activation of p53 by the coactivator protein TAFII31. *J. Biol. Chem.* **276**, 13852–7 (2001).
503. Atchley, W. R. & Fitch, W. M. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5172–6 (1997).
504. Carthew, R. W., Chodosh, L. A. & Sharp, P. A. An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter. *Cell* **43**, 439–48 (1985).
505. Moncollin, V., Miyamoto, N. G., Zheng, X. M., Egly, J. M. & Miyamoto, N. G. Purification of a factor specific for the upstream element of the adenovirus-2 major late promoter. *EMBO J.* **5**, 2577–84 (1986).
506. Sawadogo, M., Dyke, M. W. Van, Gregor, P. D. & Roeder, R. G. Multiple Forms of the Human Gene-specific Transcription Factor USF. **263**, 11994–12001 (1988).
507. Kirschbaum, B. J., Pognonec, P. & Roeder, R. G. Definition of the transcriptional activation domain of recombinant 43-kilodalton USF. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5094–101 (1992).
508. Gregor, P. D., Sawadogo, M. & Roeder, R. G. The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev.* **4**, 1730–1740 (1990).

509. Lin, Q., Luo, X. & Sawadogo, M. Archaic structure of the gene encoding transcription factor USF. *J. Biol. Chem.* **269**, 23894–903 (1994).
510. Henrion, A. A. *et al.* Structure , Sequence , and Chromosomal Location of the Gene for USF2 Transcription Factors in Mouse. **43**, 36–43 (1995).
511. Galibert, M. D., Boucontet, L., Goding, C. R. & Meo, T. Recognition of the E-C4 element from the C4 complement gene promoter by the upstream stimulatory factor-1 transcription factor. *J. Immunol.* **159**, 6176–83 (1997).
512. Cheung, E., Mayr, P., Coda-Zabetta, F., Woodman, P. G. & Boam, D. S. DNA-binding activity of the transcription factor upstream stimulatory factor 1 (USF-1) is regulated by cyclin-dependent phosphorylation. *Biochem. J.* **344 Pt 1**, 145–52 (1999).
513. Wiechers, J. W. *et al.* A new mechanism of action for skin whitening agents: binding to the peroxisome proliferator-activated receptor. *Int. J. Cosmet. Sci.* **27**, 123–32 (2005).
514. Sirito, M., Lin, Q., Maity, T. & Sawadogo, M. Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **22**, 427–33 (1994).
515. Sirito, M. *et al.* Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers. *Gene Expr.* **2**, 231–40 (1992).
516. Luo, X. & Sawadogo, M. Functional domains of the transcription factor USF2: atypical nuclear localization signals and context-dependent transcriptional activation domains. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1367–75 (1996).
517. Ferré-D'Amaré, A. R., Pognonec, P., Roeder, R. G. & Burley, S. K. Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *EMBO J.* **13**, 180–9 (1994).
518. Dang, C. V. H. I. V, Dolde, C., Gillison, M. L. & Kato, G. J. Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 599–602 (1992).
519. Fukushiy, Y. *et al.* Transcriptional control of the rat heme oxygenase gene by a nuclear protein that interacts with adenovirus 2 major late promoter. *J. Biol. Chem.* **264**, 10251–60 (1989).
520. Galibert, M. D., Miyagoe, Y., Meo, T. & Calibert, M. E-box activator of the C4 promoter is related to but distinct from the transcription factor upstream stimulating factor. *J. Immunol.* **151**, 6099–109 (1993).
521. Sirito, M., Lin, Q., Deng, J. M., Behringer, R. R. & Sawadogo, M. Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3758–63 (1998).

522. Aksan, I. & Goding, C. R. Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6930–8 (1998).
523. Sha, M., Ferré-D'Amaré, A. R., Burley, S. K. & Goss, D. J. Anti-cooperative biphasic equilibrium binding of transcription factor upstream stimulatory factor to its cognate DNA monitored by protein fluorescence changes. *J. Biol. Chem.* **270**, 19325–9 (1995).
524. Rodríguez, C. I., Gironès, N. & Fresno, M. Cha, a basic helix-loop-helix transcription factor involved in the regulation of upstream stimulatory factor activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 43135–45 (2003).
525. Vallet, V. S. *et al.* Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose. *J. Biol. Chem.* **273**, 20175–9 (1998).
526. Casado, M., Vallet, V. S., Kahn, a & Vaulont, S. Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver. *J. Biol. Chem.* **274**, 2009–13 (1999).
527. Qyang, Y. *et al.* Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1508–17 (1999).
528. Pawar, S. A., Szentirmay, M. N., Hermeking, H. & Sawadogo, M. Evidence for a cancer-specific switch at the CDK4 promoter with loss of control by both USF and c-Myc. *Oncogene* **23**, 6125–35 (2004).
529. Sawadogo, M. & Roeder, R. G. Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* **43**, 165–75 (1985).
530. Chiang, C. M. & Roeder, R. G. Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* **267**, 531–6 (1995).
531. Ge, Y., Jensen, T. L., Matherly, L. H. & Taub, J. W. Physical and functional interactions between USF and Sp1 proteins regulate human deoxycytidine kinase promoter activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 49901–10 (2003).
532. Meisterernst, M., Horikoshi, M. & Roeder, R. G. Recombinant yeast TFIID, a general transcription factor, mediates activation by the gene-specific factor USF in a chromatin assembly assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9153–7 (1990).
533. Roy, A. L. *et al.* Cloning of an inr- and E-box-binding protein, TFII-I, that interacts physically and functionally with USF1. *EMBO J.* **16**, 7091–104 (1997).
534. Lu, T.-C. *et al.* Retinoic acid utilizes CREB and USF1 in a transcriptional feed-forward loop in order to stimulate MKP1 expression in human

- immunodeficiency virus-infected podocytes. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5785–94 (2008).
535. Jüttner, S. *et al.* Helicobacter pylori stimulates host cyclooxygenase-2 gene transcription: critical importance of MEK/ERK-dependent activation of USF1/-2 and CREB transcription factors. *Cell. Microbiol.* **5**, 821–834 (2003).
 536. Xiao, Q., Kenessey, A. & Ojamaa, K. Role of USF1 phosphorylation on cardiac alpha-myosin heavy chain promoter activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H213–9 (2002).
 537. Wang, Y. *et al.* Phosphorylation and recruitment of BAF60c in chromatin remodeling for lipogenesis in response to insulin. *Mol. Cell* **49**, 283–97 (2013).
 538. Nowak, M. *et al.* Insulin-mediated down-regulation of apolipoprotein A5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1537–48 (2005).
 539. Wong, R. H. F. *et al.* A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin. *Cell* **136**, 1056–72 (2009).
 540. Köberle, M. *et al.* Yersinia enterocolitica YopT and Clostridium difficile toxin B induce expression of GILZ in epithelial cells. *PLoS One* **7**, e40730 (2012).
 541. Ansorge, N. *et al.* An upstream CRE-E-box element is essential for gastrin-dependent activation of the cyclooxygenase-2 gene in human colon cancer cells. *Regul. Pept.* **144**, 25–33 (2007).
 542. Wu, Y.-L. & Wiltbank, M. C. Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene changes from protein kinase (PK) A- to PKC-dependence after luteinization of granulosa cells. *Biol. Reprod.* **66**, 1505–14 (2002).
 543. Hock, T. D., Nick, H. S. & Agarwal, A. Upstream stimulatory factors, USF1 and USF2, bind to the human haem oxygenase-1 proximal promoter in vivo and regulate its transcription. *Biochem. J.* **383**, 209–18 (2004).
 544. Andrews, G. K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 95–104 (2000).
 545. Andrews, G. K. *et al.* The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development. *EMBO J.* **20**, 1114–22 (2001).
 546. Tasheva, E. S. & Conrad, G. W. The UV responsive elements in the human mimecan promoter: a functional characterization. *Mol. Vis.* **9**, 1–9 (2003).
 547. Riccio, A. *et al.* Transforming growth factor beta 1-responsive element: closely associated binding sites for USF and CCAAT-binding transcription factor-

- nuclear factor I in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1846–55 (1992).
548. Qi, L. *et al.* PAI-1 transcriptional regulation during the G0 --> G1 transition in human epidermal keratinocytes. *J. Cell. Biochem.* **99**, 495–507 (2006).
 549. Kutz, S. M. *et al.* TGF-beta 1-induced PAI-1 expression is E box/USF-dependent and requires EGFR signaling. *Exp. Cell Res.* **312**, 1093–105 (2006).
 550. Cogswell, J. P., Godlevski, M. M., Bonham, M., Bisi, J. & Babiss, L. Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2782–90 (1995).
 551. Luo, X. & Sawadogo, M. Antiproliferative properties of the USF family of helix-loop-helix transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1308–13 (1996).
 552. Aperlo, C., Boulukos, K. E., Sage, J., Cuzin, F. & Pognonec, P. Complete sequencing of the murine USF gene and comparison of its genomic organization to that of mFIP/USF2. *Genomics* **37**, 337–44 (1996).
 553. Ismail, P. M., Lu, T. & Sawadogo, M. Loss of USF transcriptional activity in breast cancer cell lines. *Oncogene* **18**, 5582–91 (1999).
 554. Jung, H. S. *et al.* USF inhibits cell proliferation through delay in G2/M phase in FRTL-5 cells. *Endocr. J.* **54**, 275–85 (2007).
 555. Moon, J. J., Rubio, E. D., Martino, A., Krumm, A. & Nelson, B. H. A permissive role for phosphatidylinositol 3-kinase in the Stat5-mediated expression of cyclin D2 by the interleukin-2 receptor. *J. Biol. Chem.* **279**, 5520–7 (2004).
 556. North, S. *et al.* Regulation of cdc2 gene expression by the upstream stimulatory factors (USFs). *Oncogene* **18**, 1945–55 (1999).
 557. Goueli, B. S. & Janknecht, R. Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor. *Oncogene* **22**, 8042–7 (2003).
 558. Chang, J. T.-C., Yang, H.-T., Wang, T.-C. V & Cheng, A.-J. Upstream stimulatory factor (USF) as a transcriptional suppressor of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in oral cancer cells. *Mol. Carcinog.* **44**, 183–92 (2005).
 559. Jaiswal, A. S. & Narayan, S. Upstream stimulating factor-1 (USF1) and USF2 bind to and activate the promoter of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene. *J. Cell. Biochem.* **81**, 262–77 (2001).
 560. Davis, P. L., Miron, a, Andersen, L. M., Iglehart, J. D. & Marks, J. R. Isolation and initial characterization of the BRCA2 promoter. *Oncogene* **18**, 6000–12 (1999).

561. Kanaya, T. *et al.* Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin. Cancer Res.* **6**, 1239–47 (2000).
562. Wu, K., Jiang, S.-W. & Couch, F. J. p53 mediates repression of the BRCA2 promoter and down-regulation of BRCA2 mRNA and protein levels in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **278**, 15652–60 (2003).
563. Jaiswal, A. S. & Narayan, S. p53-dependent transcriptional regulation of the APC promoter in colon cancer cells treated with DNA alkylating agents. *J. Biol. Chem.* **276**, 18193–9 (2001).
564. Gomes, N. P. & Espinosa, J. M. Disparate chromatin landscapes and kinetics of inactivation impact differential regulation of p53 target genes. *Cell Cycle* **9**, 3428–3437 (2010).
565. Latonen, L., Taya, Y. & Laiho, M. UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene* **20**, 6784–93 (2001).
566. Vassilev, L. T. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* **13**, 23–31 (2007).
567. Vassilev, L. T. *et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844–8 (2004).
568. Tovar, C. *et al.* Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1888–93 (2006).
569. Benavides, M. a *et al.* Methionine inhibits cellular growth dependent on the p53 status of cells. *Am. J. Surg.* **193**, 274–83 (2007).
570. Janjetovic, K. *et al.* In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin. *Eur. J. Pharmacol.* **668**, 373–82 (2011).
571. Ji, Z. *et al.* p53 rescue through HDM2 antagonism suppresses melanoma growth and potentiates MEK inhibition. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 356–64 (2012).
572. Garnett, M. J. *et al.* Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature* **483**, 570–5 (2012).
573. De Lange, J. *et al.* Synergistic growth inhibition based on small-molecule p53 activation as treatment for intraocular melanoma. *Oncogene* **31**, 1105–16 (2012).
574. Yang, G., Zhang, G., Pittelkow, M. R., Ramoni, M. & Tsao, H. Expression profiling of UVB response in melanocytes identifies a set of p53-target genes. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 2490–506 (2006).

575. Lee, M.-H. & Lozano, G. Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 sigma and other proteins. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 225–34 (2006).
576. Yang, H., Wen, Y., Chen, C., Lee, M. & Lozano, G. 14-3-3 σ Positively Regulates p53 and Suppresses Tumor Growth 14-3-3 Positively Regulates p53 and Suppresses Tumor Growth. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7096–107 (2003).
577. Aperlo, C., Boulukos, K. E. & Pognonec, P. repeat transcription factor USF interferes with Ras transformation. **253**, 249–253 (1996).
578. Bendjennat, M. *et al.* UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair. *Cell* **114**, 599–610 (2003).
579. McDonald, E. R., Wu, G. S., Waldman, T. & El-Deiry, W. S. Repair Defect in p21 WAF1/CIP1 $-/-$ human cancer cells. *Cancer Res.* **56**, 2250–5 (1996).
580. Al-Khalaf, H. H., Hendrayani, S.-F. & Aboussekhra, A. ATR controls the p21(WAF1/Cip1) protein up-regulation and apoptosis in response to low UV fluences. *Mol. Carcinog.* **51**, 930–8 (2012).
581. Abbas, T. *et al.* PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex. *Genes Dev.* **22**, 2496–506 (2008).
582. Avkin, S. *et al.* p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load. *Mol. Cell* **22**, 407–13 (2006).
583. Haapajarvi, T. *et al.* UV radiation is a transcriptional inducer of p21(Cip1/Waf1) cyclin-kinase inhibitor in a p53-independent manner. *Exp. Cell Res.* **248**, 272–9 (1999).
584. Li, H., Zhang, X.-P. & Liu, F. Coordination between p21 and DDB2 in the cellular response to UV radiation. *PLoS One* **8**, e80111 (2013).
585. Gottifredi, V., McKinney, K., Poyurovsky, M. V & Prives, C. Decreased p21 levels are required for efficient restart of DNA synthesis after S phase block. *J. Biol. Chem.* **279**, 5802–10 (2004).
586. Martín-Caballero, J., Flores, J. M., García-Palencia, P. & Serrano, M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res.* **61**, 6234–8 (2001).
587. Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. & Leder, P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**, 675–84 (1995).
588. Hyka-Nouspikel, N. *et al.* Deficient DNA damage response and cell cycle checkpoints lead to accumulation of point mutations in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **30**, 1901–10 (2012).

589. Saramäki, A., Banwell, C. M., Campbell, M. J. & Carlberg, C. Regulation of the human p21(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D3 receptor. *Nucleic Acids Res.* **34**, 543–54 (2006).
590. Herold, S. *et al.* Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol. Cell* **10**, 509–21 (2002).
591. Enk, C. D. *et al.* The UVB-induced gene expression profile of human epidermis in vivo is different from that of cultured keratinocytes. *Oncogene* **25**, 2601–14 (2006).
592. Pietenpol, J. a & Stewart, Z. a. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* **181-182**, 475–81 (2002).
593. Xu, J. & Morris, G. F. P53-Mediated Regulation of Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Cells Exposed To Ionizing Radiation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 12–20 (1999).
594. Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A. J. & Drobetsky, E. A. A p53-independent pathway for induction of p21waf1cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Res.* **57**, 3390–4 (1997).
595. Watanabe-Fukunaga, R., Iida, S., Shimizu, Y., Nagata, S. & Fukunaga, R. SEI family of nuclear factors regulates p53-dependent transcriptional activation. *Genes Cells* **10**, 851–60 (2005).
596. Lew, Q. J. *et al.* Identification of HEXIM1 as a positive regulator of p53. *J. Biol. Chem.* **287**, 36443–54 (2012).
597. Bachmann, I. M., Straume, O., Puntervoll, H. E., Kalvenes, M. B. & Akslen, L. A. Importance of P-cadherin, beta-catenin, and Wnt5a/frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. *Clin. Cancer Res.* **11**, 8606–14 (2005).
598. Bonner, W. M. *et al.* GammaH2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 957–67 (2008).
599. Crusselle-Davis, V. J. *et al.* Recruitment of coregulator complexes to the beta-globin gene locus by TFII-I and upstream stimulatory factor. *FEBS J.* **274**, 6065–73 (2007).
600. Crusselle-Davis, V. J., Vieira, K. F., Zhou, Z., Anantharaman, A. & Bungert, J. Antagonistic regulation of beta-globin gene expression by helix-loop-helix proteins USF and TFII-I. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6832–43 (2006).
601. Huang, S., Li, X., Yusufzai, T. M., Qiu, Y. & Felsenfeld, G. USF1 recruits histone modification complexes and is critical for maintenance of a chromatin barrier. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7991–8002 (2007).

602. Chatterjee, T. K. *et al.* Histone deacetylase 9 is a negative regulator of adipogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* **286**, 27836–47 (2011).
603. Sakaguchi, K. *et al.* DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev.* **12**, 2831–2841 (1998).
604. Lodygin, D., Yazdi, A. S., Sander, C. A., Herzinger, T. & Hermeking, H. Analysis of 14-3-3sigma expression in hyperproliferative skin diseases reveals selective loss associated with CpG-methylation in basal cell carcinoma. *Oncogene* **22**, 5519–24 (2003).
605. Dellambra, E. *et al.* Downregulation of 14-3-3sigma prevents clonal evolution and leads to immortalization of primary human keratinocytes. *J. Cell Biol.* **149**, 1117–30 (2000).
606. Jiang, W., Ananthaswamy, H. N., Muller, H. K. & Kripke, M. L. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene* **18**, 4247–53 (1999).
607. Benjamin, C. L., Melnikova, V. O. & Ananthaswamy, H. N. P53 protein and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **624**, 265–82 (2008).
608. Krauthammer, M. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* **44**, 1006–14 (2012).
609. Durinck, S. *et al.* Temporal dissection of tumorigenesis in primary cancers. *Cancer Discov.* **1**, 137–43 (2011).
610. Bamford, S. *et al.* The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br. J. Cancer* **91**, 355–8 (2004).
611. COSMIC: Gene overview for USF1. at <<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/overview?search=&ln=USF1>>
612. Pezzolesi, M. G., Zbuk, K. M., Waite, K. a & Eng, C. Comparative genomic and functional analyses reveal a novel cis-acting PTEN regulatory element as a highly conserved functional E-box motif deleted in Cowden syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1058–71 (2007).
613. Farooq, a, Walker, L. J., Bowling, J. & Audisio, R. a. Cowden syndrome. *Cancer Treat. Rev.* **36**, 577–83 (2010).
614. Nandakumar, V., Vaid, M., Tollefsbol, T. O. & Katiyar, S. K. Aberrant DNA hypermethylation patterns lead to transcriptional silencing of tumor suppressor genes in UVB-exposed skin and UVB-induced skin tumors of mice. *Carcinogenesis* **32**, 597–604 (2011).

615. Brown, V. L. *et al.* p16INK4a and p14ARF tumor suppressor genes are commonly inactivated in cutaneous squamous cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 1284–92 (2004).
616. Bussière, F. I. *et al.* H. pylori-induced promoter hypermethylation downregulates USF1 and USF2 transcription factor gene expression. *Cell. Microbiol.* **12**, 1124–33 (2010).
617. Touati, E. *et al.* Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice¹ ¹This report is dedicated to the memory of Prof. Maurice Hofnung. *Gastroenterology* **124**, 1408–1419 (2003).
618. Touati, E. When bacteria become mutagenic and carcinogenic: lessons from *H. pylori*. *Mutat. Res.* **703**, 66–70 (2010).
619. Machado, A. M. D. *et al.* *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2995–3002 (2009).
620. Ovcharenko, I., Loots, G. G., Hardison, R. C., Miller, W. & Stubbs, L. zPicture: dynamic alignment and visualization tool for analyzing conservation profiles. *Genome Res.* **14**, 472–7 (2004).

VU :

Le Directeur de Thèse
(Nom et Prénom)

VU :

Le Responsable de l'École Doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINEAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,
(Nom et Prénom)

Résumé

L'exposition aux ultraviolets solaires constitue un facteur de risque majeur dans le développement de cancers cutanés. L'initiation de ces cancers est cependant pondérée par des mécanismes cellulaires de protection qui contrecarrent l'instabilité génomique éventuellement promue par les UV. Dans ces mécanismes, le suppresseur de tumeur p53 joue un rôle fondamental en régulant l'expression de nombreux gènes permettant de bloquer le cycle cellulaire et de réparer l'ADN ou, si les dommages cellulaires sont trop importants, d'activer l'apoptose. Les régulateurs de la stabilité de la protéine p53 en réponse au stress UV sont ainsi capitaux pour assurer la stabilité du génome. En réponse au stress UV *in vivo* et *in vitro*, nous mettons en évidence que le facteur de transcription USF1 est primordial à l'activation du programme génétique contrôlé par la protéine p53. Nos données convergent vers un modèle dans lequel USF1 agit sur la voie p53 par deux moyens. D'une part, USF1, assure par interaction physique la stabilité de p53 en contrecarrant de manière mutuellement exclusive l'association du suppresseur de tumeur à MDM2 son inhibiteur physiologique. D'autre part, USF1 agit synergiquement avec le suppresseur de tumeur pour transcrire certains gènes cibles de p53 comme le régulateur du cycle cellulaire *CDKN1A* (p21). Ces deux niveaux de régulation dépendent étroitement du niveau de stress et permettent d'assurer un contrôle optimal de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à l'exposition UV. Collectivement, nos données montrent qu'USF1, par le contrôle de la voie p53, est un facteur essentiel contre l'instabilité génomique induite par les UV.

Mots clés: UV, peau, cancers, p53, USF1, dommages à ADN, cycle cellulaire.

Abstract

Ultraviolets (UV) solar exposure is a critical risk factor in skin cancers development. Initiation of these cancers is however lowered by cellular protective mechanisms that counteract the genomic instability potentially promoted by UV. In these mechanisms p53 protein is critical in regulating a large number of genes that blocks the cell cycle to allow DNA repair or, if damages are beyond repair, to activate apoptosis. The regulators of p53 stability in response to UV are thus crucial to ensure genomic stability. In response to UV stress, we found by *in vivo* and *in vitro* studies that USF1 is essential in the activation of p53 genetic program. Our data converge to a model whereby USF1 acts on p53 pathway by two means. On one hand, USF1 stabilizes p53 from MDM2 mediated degradation by a physical association to the tumor suppressor in a MDM2 mutually exclusive manner. On the other hand USF1 synergizes with the tumor suppressor in the transcription of several targets of p53 protein and particularly the *CDKN1A* inhibitor of the cell cycle. These two levels of regulation are closely dependent in the stress level and ensure an optimal control of the cell cycle progression in response to UV. Collectively, our results show that USF1, by controlling p53 pathway, is a critical factor against the genomic instability promoted by UV.

Keywords: UV, skin, cancers, p53, USF1, DNA damages, cell cycle.